Leiden
1958

INVLOED VAN POLY-ANIONEN OP DE REPRODUCTIE VAN BOFVIRUS IN CHORIOALLANTOIS MEMBRAAN

M. P. M. HERRMANN-ERLEE

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY

INVLOED VAN POLY-ANIONEN OP DE REPRODUCTIE VAN BOFVIRUS IN CHORIOALLANTOIS MEMBRAAN

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/invloedvanpolyan0000mpmh

INVLOED VAN POLY-ANIONEN OP DE REPRODUCTIE VAN BOFVIRUS IN CHORIOALLANTOIS MEMBRAAN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr. S. E. DE JONGH, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, PUBLIEK TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 4 JUNI 1958 TE 16 UUR

DOOR

MARIA PETRONELLA MARGARETHA HERRMANN-ERLEE

GEBOREN TE SURABAIA (JAVA) IN 1928

UITGEVERIJ EXCELSIOR - ORANJEPLEIN 96 - 'S-GRAVENHAGE

Promotor: Prof. Dr. H. Veldstra

Aan mijn ouders
Aan mijn man

INHOUD

Hoofdstuk I.	Inleiding	9
Hoofdstuk II.	Literatuuroverzicht	10
	A. Onderzoekingen over de etiologie van bof	10
	B. Bof	11
	C. Classificatie van het bofvirus (Myxovirus parotitidis)	11
	D. Vorm en afmeting van het bofvirus	13
	E. Haemagglutinatie door virussen van de Myxogroep	14
	F. Reproductie van influenza- en bofvirus in de gastheercellen	21
	G. Remming van de bofvirus reproductie	25
Hoofdstuk III.	Materiaal en methoden	27
	A. Enkele opmerkingen uit de literatuur betreffende het gebruik van bebroede kippeneieren in het virusonderzoek	27
	B. Materiaal	28
	C. Methodieken	29
Hoofdstuk IV.	Remming van de bofvirus reproductie Overzicht stoffen	39
Hoofdstuk V.	Invloed van de op de virusremming onderzochte stoffen op de ademhaling van het chorioallantois membraan	46
Hoofdstuk VI.	Remming van de bofvirus reproductie Experimenten	56
Hoofdstuk VII.	Onderzoek naar het werkingsmechanisme van Suramine	62
	A. Invloed van Suramine op de adsorptie van virus aan weefsel	63
	B. Invloed van het moment van toedienen van Suramine op de virusreproductie	65
Hoofdstuk VIII.	Invloed van poly-anionen op de haemagglutinatie door virussen van de Myxogroep	75
	A. Congorood	76

B. Suramine 79
C. Invloed van de andere poly-anionen op de haemagglutinatie door bofvirus 83

Discussie en samenvatting 86

Discussion and summary 89

Literatuur 93

Bofvirus geadsorbeerd aan een erythrocyten-membraan (afkomstig van gehaemolyseerde kippenerythrocyten).
Electronenmicroscoop foto, Drs. W. G. Braams.
Vergroting 12.000 maal.
In het centrum kern van de erythrocyt, op het membraan zijn de virusdeeltjes zichtbaar.
Voor techniek zie pagina 14

Hoofdstuk I

INLEIDING

Het uitgangspunt van ons onderzoek over beinvloeding van de reproductie van bofvirus lag in Wolff's analyse dezer reproductie in het chorioallantois membraan met behulp van de rolcultuur-techniek (112) en in ons orienterend onderzoek betreffende de remmende werking van Suramine (179).

De daardoor met dit virus verkregen ervaring maakte het aantrekkelijk het in meer algemene zin als test object voor proeven over remming van virus te benutten (voor Materiaal en Methoden, zie Hoofdstuk III).

Mede op grond van hetgeen omtrent de interactie tussen virussen van de Myxogroep (in het bijzonder van influenzavirus) en de gastheer cel bekend geworden is (vgl. literatuuroverzicht in Hoofdstuk II) werd in samenhang met een voortgezette analyse van de werking van Suramine een aantal poly-anionen in ons onderzoek betrokken (zie Hoofdstuk IV, VI). Deze varieren in hun molecuulgrootte, verdeling en type van de geladen groepen.

Hoewel bekend is, dat virusreproductie ook onder voor het weefsel ongunstige omstandigheden kan plaats vinden, werd in een serie Warburg proeven de invloed van de potentiele remstoffen op stukjes chorioallantois membraan nagegaan, teneinde een indruk te verkrijgen van een eventuele toxiciteit voor dit weefsel (zie Hoofdstuk V).

Voor Suramine werd meer in detail het werkingsmechanisme onderzocht, door het agens op verschillende tijdstippen in de virusontwikkeling toe te voegen (zie Hoofdstuk VII).

Het feit, dat Congorood de haemagglutinatie in sterke mate bleek te remmen was aanleiding ook de andere poly-anionen op deze eigenschap te onderzoeken. Door een meer gedetailleerde analyse van Congorood en Suramine werd getracht enig inzicht in het verschijnsel van haemagglutinatie-remming te verkrijgen (zie Hoofdstuk VIII).

Hoofdstuk II

LITERATUUROVERZICHT

A. *Onderzoekingen over de etiologie van bof*

Bof – parotitis epidemica – is een ziekte, die vrijwel in alle landen van de wereld voorkomt. Dat het ziektebeeld reeds in vroegere tijden bekend was leert ons Hippocrates, die in de vijfde eeuw vóór Christus de meest voorkomende verschijnselen van de ziekte duidelijk aangaf. Zijn beschrijving is die van een milde epidemische ziekte, gekarakteriseerd door een niet etterende zwelling bij de oren, zo nu en dan vergezeld door een pijnlijke vergroting van de testis (vgl. 1, 2, 3, 4).

Uit onderzoekingen is gebleken, dat het causale agens van bof een filtreerbaar virus is (vgl. 5, 6). Granata (7) was de eerste, die deze mogelijkheid suggereerde. Deze onderzoeker injiceerde konijnen subcutaan, intraveneus of direct in de speekselklier met door een Berkefeld-kaars W gefiltreerd speeksel van bofpatiënten. Als gevolg hiervan kon een duidelijke temperatuursverhoging (40°C.) worden waargenomen, terwijl injectie met normaal speeksel geen effect had.

Later is gebleken (vgl. 5), dat, hoewel de proeven van Granata op de juiste wijze waren genomen, zijn conclusies op niet specifieke reacties waren gebaseerd.

Na Granata slaagde een aantal onderzoekers er vervolgens in de ziekte experimenteel over te brengen op apen (vgl. 5). De dieren werden daarbij intracerebraal, direct in de speekselklier of in de ductus parotideus geinjiceerd met al of niet door Berkefeld-kaars gefiltreerd speeksel, afkomstig van bofpatiënten, afgenomen gedurende de eerste dagen van hun ziekte.

Een aantal apen stierf met meningeale symptomen op de vierde dag na intracerebrale injectie met infectieus materiaal. Injectie in de speekselklier of instillatie in de ductus parotideus gaf aanvankelijk de bovenvermelde onspecifieke reacties en leidde 6 - 8 dagen later tot vergroting van de parotisklier, temperatuursverhoging en leucopenie. De koortsperiode duurde ongeveer drie dagen, waarna zwelling van de speekselklier afnam.

Behalve in het speeksel van bofpatiënten, kon o.a. met deze proeven het infectieuze agens ook worden aangetoond in het cerebrospinaalvocht en in het bloed (vgl. 5).

Zeer belangrijk voor het onderzoek naar de etiologie van bof waren de onderzoekingen van Habel (8) en Levens en Enders (9). Deze onderzoekers slaagden er in 1945 kort na elkaar in een aan een aap geadapteerde bofvirus-stam te kweken in bebroede kip-

peneieren, een relatief goedkoop en gemakkelijk in grote hoeveelheden verkrijgbaar „kweekmedium" voor virussen.

Kort hierna kwamen Beveridge, Lind en Anderson (10) op de gedachte het van patienten afgenomen speeksel direct in bebroede kippeneieren te enten; de daarna optredende vermeerdering van het virus kon met de z.g.n. haemagglutinatietest worden aangetoond. Henlo en McDougall (11), Kilham (12), Hook en medewerkers (13) en Kilham (14) slaagden er vervolgens op deze wijze in om het virus te isoleren uit cerebrospinaalvocht, bloed, testis en melk van geinfecteerde patienten.

B. *Bof*

De term „bof" wordt zeer frequent gebruikt als synoniem voor „parotitis epidemica", doch dit is niet geheel juist. Het is zeker, dat parotitis epidemica de meest voorkomende verschijningsvorm is van de door het virus veroorzaakte infectieziekte, maar het is zeker niet de enige. De voornaamste andere uitingen van bof zijn: meningo-encephalitis, orchitis, pancreatitis en ovaritis. In het algemeen treden deze verschijnselen 4 - 11 dagen na het begin van de parotitis op; in een aantal gevallen echter kunnen zij òf aan de parotitis voorafgaan, òf tegelijkertijd, òf zelfs onafhankelijk plaats vinden. Het lijkt daarom beter de term „bof" voor alle genoemde uitingsvormen gezamenlijk te gebruiken en de term „parotitis epidemica" uitsluitend te beperken tot gevallen, waarbij het de aandoening van de speekselklieren betreft (vgl. 5).

Uit de in het voorgaande aangehaalde experimenten blijkt, dat „bof" een infectieziekte is, waarvan het causale agens met de bloedstroom door het lichaam wordt verspreid. De besmetting treedt aerogeen op. Volgens Kilham(15) localiseert het virus zich steeds het eerst in de speekselklier en vindt daar de reproductie plaats, al of niet gepaard gaande met zwelling van deze klier. Burnet (16) meent daarentegen, dat het virus zich aanvankelijk nestelt in de epitheelcellen van de ademhalingswegen en daar een subklinische infectie veroorzaakt. Hierbij wordt voldoende virus geproduceerd, om door het bloed verspreid, andere organen, zoals speekselklieren, gonaden, pancreas en centrale zenuwstelsel te infecteren.

Voor beschrijving van de door het bofvirus veroorzaakte ziekteverschijnselen wordt verwezen naar Feiling (17), Gordon en Kilham (18), van Rooyen en Rhodes (5) en Rivers (6).

C. *Classificatie van het bofvirus (Myxovirus parotitidis)*

Burnet (4) plaatst in de door hem ontworpen indeling van de dierlijke virussen het bofvirus, tezamen met de influenzavirusstammen A, B en C, „fowl plague" – (vogelpest-) en New Castle Disease – virus in de groep der Myxovirussen, met groepsnaam Myxovirus. Deze naam duidt op de speciale affiniteit

van de virussen voor bepaalde mucinen. In zijn nomenclatuur geeft Burnet het bofvirus de naam Myxovirus parotitidis.

Een korte beschrijving van de groep der Myxovirussen is als volgt (vgl. 19).

Morfologie. De vorm is die van bolletje met een diameter van 60 - 200 mμ, meestal van 80 - 150 mμ. Soms zijn ook filamenten in de viruspraeparaten aanwezig, doch M. parotitidis maakt hierop een uitzondering. De lengte van de filamenten bedraagt verscheidene microns; de dikte komt overeen met die van de bolletjes.

Physische en chemische eigenschappen. De dichtheid bedraagt 1,10 - 1,14 (bofvirus 1,10). De virussen zijn zeer stabiel bij een temperatuur van -76°C. De infectieuze eigenschappen worden gemakkelijk vernietigd door behandeling met afgekoelde aether.

Chemische samenstelling. De virussen blijken volgens recente onderzoekingen te zijn opgebouwd uit een ring van ribonucleoproteine, ingesloten door een eiwitomhulsel. Behalve deze componenten kunnen bij de influenzavirussen, New Castle Disease- en „fowl plague"-virus, koolhydraten en lipoiden worden aangetroffen.

Haemagglutinatie. De virussen hechten zich gemakkelijk aan het oppervlak van erythrocyten van kippen en andere vertebraten, met als gevolg haemagglutinatie (samenklontering van de erythrocyten). Door een aan het virus eigen enzymatische reactie dissocieert (elueert) het virus vervolgens meer of minder compleet van de erythrocyt, samengaande met een irreversibele verandering van de mucoproteine-receptor op de erythrocytenwand. Het verschijnsel van elutie is voor het bofvirus nog enigszins problematisch, hierop zal op pag. 20 verder worden ingegaan. De adsorptie van (en haemagglutinatie door) de virussen wordt verhinderd door vrij in zoogdiersera en in andere biologische vochten aanwezige mucoproteinen. Erythrocyten, welke met „receptor-destroying enzyme" van *Vibrio cholerae* zijn behandeld, worden niet meer door de virussen van de groep geagglutineerd. Behalve het vermogen tot haemagglutinatie bezitten het bof- en New Castle Disease-virus ook nog haemolyserende eigenschappen (zie pagina 20).

Natuurlijke overdracht. Gewoonlijk d. m. v. met de ademhalingslucht aangevoerde secretie productên (druppeltjes van Flügge). Arthropoden zijn niet als vectoren bekend.

Reproductie. Reproductie „in vitro" kan men doen plaats vinden na enting van het virus in de amnionholte van bebroede kippeneieren; na adaptatie eveneens na enting in de allantoisholte (zie Hoofdstuk III, A). De virusreproductie vindt ook plaats in cultures van kippen- en zoogdier-weefsels.

Biotoop. Gewoonlijk in de slijmvliezen van de ademhalingswegen van zoogdieren of vogels. De virussen kunnen algemene infecties veroorzaken; zij kunnen in het bloed en in verschillende organen worden aangetroffen.

Pathogenese. De virussen veroorzaken òf latente, òf duidelijk zichtbare infecties als gevolg van een ontsteking, voornamelijk

van de ademhalingswegen. Sommige virussen (influenza A, B) zijn in staat, na adaptatie, een overentbare pneumonie in muizen en hamsters te doen ontstaan. Ook encephalitis kan na adaptatie in genoemde proefdieren door de virussen worden veroorzaakt; deze is voor het bofvirus en voor het New Castle Disease virus overentbaar, voor andere virussen (influenza, uitgezonderd de neurotrope influenza WS-stam) niet.

D. *Vorm en afmetingen van het bofvirus*

Een aantal malen werd een onderzoek verricht naar de morfologie en de physisch-chemische eigenschappen van het bofvirus (20 - 25). Daarvoor was het noodzakelijk, dat over een gezuiverde virussuspensie kon worden beschikt.

Daartoe is fractionering met de ultracentrifuge geschikt gebleken (20 - 22, 25). Een bezwaar is evenwel, dat bij het centrifugeren als gevolg van de geringe stabiliteit van het virus, een groot deel van het infectievermogen (tot 90%) en het haemagglutinatievermogen (tot 50%) verloren gaat (20, 21).

De gezuiverde viruspraeparaten werden gebruikt voor sedimentatie-analyse en voor het bepalen van vorm en afmeting van de virusdeeltjes met het electronenmicroscoop (20 - 22, 24, 25).

Wezen de sedimentatie proeven reeds op een grote spreiding in deeltjes-grootte (diffuse sedimentatiegrens), de resultaten van het electronen-microscopische onderzoek bevestigden dit vermoeden. De volgende waarden werden opgegeven:

Diameter	Methode	Ref.
100 - 150 mμ	gradocol-filtratie	22
114 - 143 mμ	sedimentatie-analyse	22
140 ± 30 mμ	electronenmicroscoop	22
90 - 130 mμ	gradocol-filtratie	23
171 ± 31,1 mμ	electronenmicroscoop (met formol behandeld virus, niet geschaduwd)	20, 21
191 ± 31,6 mμ	electronenmicroscoop (idem, wel geschaduwd)	20, 21
233 ± 35 mμ	electronenmicroscoop (onbehandeld virus, niet geschaduwd)	20, 21

De electronen worden door het natuurlijke virus zeer weinig gestrooid. Dientengevolge zijn de beelden vaag en is de omtrek der virusdeeltjes onduidelijk. Behandeling van het virus met formol voert tot veel duidelijker beelden, waarvan nauwkeurige af-

metingen zijn te verkrijgen (20, 21). Onder invloed van het formaline verandert evenwel de vorm en de grootte van de virusdeeltjes.

Van de onbehandelde virusdeeltjes blijkt niet alleen de afmeting, doch ook de vorm sterk te varieren. Sommige deeltjes zijn rond, andere langwerpig, vele zijn onregelmatig van vorm (20, 21, 25). De deeltjes hebben een amoeboid-achtig uiterlijk met een of meer uitsteeksels. Formaline-behandeling leidt tot afronding der deeltjes en dus tot grotere uniformiteit, terwijl uit geschaduwde praeparaten blijkt, dat een groot aantal virusdeeltjes sterk is afgeplat (20, 21, 24, 25).

Onderzoek naar de morfologie van de virusdeeltjes werd grotendeels verricht aan met de ultracentrifuge afgescheiden virusmateriaal. Een zekere mate van vervorming onder invloed van de sterke centrifugaalkrachten mocht niet worden uitgesloten (24).

Een techniek, welke gebruik maakt van het vermogen van bof- en influenza-virus zich aan erythrocyten te adsorberen, mist de bezwaren van de bovengenoemde technieken (24, 25). Kippenerythrocyten werden eerst met saponine gehaemolyseerd, waarna adsorptie van het virus werd bewerkstelligd bij $0^{o}C$. De vervolgens bepaalde deeltjes-grootte bedroeg volgens Dawson en Elford (24) 179 ± 28 mμ, volgens Ray en Swain (25) 193 - 196,5 mμ. Ook bij deze techniek werd een sterke afplatting van de virusdeeltjes geconstateerd; het aangehechte virus bleek regelmatig over het erythrocytenmembraan verspreid (zie ook figuur 1).

Met de beschreven techniek kon ook worden aangetoond, dat de bizarre en zeer onregelmatige vormen van de deeltjes, zoals die bij de ultracentrifuge-techniek worden geconstateerd, zeer waarschijnlijk artefacten zijn, aangezien aan de erythrocytenwand slechts regelmatig gevormde deeltjes van uniforme afmetingen bleken voor te komen (25).

Uit recent onderzoek naar de samenstelling van het bofvirus blijkt, dat het deeltje o.a. is opgebouwd uit een voor trypsine resistente ring van ribonucleoproteine. De ring, waarvan de diameter ongeveer overeenkomt met die van het bolletje, is ingesloten in een eiwitmembraan (25a).

E. *Haemagglutinatie door virussen van de Myxogroep*

Zoals reeds op pagina 12 werd vermeld, is aan alle virussen van de Myxogroep het vermogen erythrocyten te agglutineren eigen. Het haemagglutinatie- en het daaropvolgende elutie-verschijnsel vindt volgens Burnet (26) voor alle betrokken virussen op overeenkomstige wijze plaats; ook zou eenzelfde type van celreceptor bij de agglutinatie-reactie zijn betrokken. Dit neemt echter niet weg dat quantitatieve verschillen in de werkzaamheid van de verschillende virusenzymen werden geconstateerd (receptor gradient, zie pagina 20).

Het experimentele onderzoek naar de verklaring van de haemagglutinatie door de virussen van de Myxogroep werd aanvanke-

lijk vrijwel uitsluitend met het influenzavirus verricht. Het gevolg hiervan is, dat op essentiële punten de gegevens betreffende dit verschijnsel voor het bofvirus schaars zijn. De met bofvirus verkregen resultaten blijken ten dele in overeenstemming met het voor het influenzavirus verkregen beeld van de haemagglutinatie (adsorptie en de daaropvolgende elutie van het virusdeeltje van de erythrocyt), voor een ander deel hiervan evenwel sterk af te wijken (irreversibele adsorptie aan en haemolyse van de erythrocyten door de bofvirus deeltjes, zie pagina 20).

Het is vrij waarschijnlijk, dat de adsorptie-elutie-verschijnselen die zich tussen virus en erythrocytenwand afspelen analoog zijn aan die, welke een rol spelen bij de infectie (adsorptie, penetratie) van een voor het virus gevoelige gastheercel.

Een kort overzicht van essentiële gegevens hieromtrent moge hier volgen.

Het haemagglutinatie-fenomeen werd voor het eerst door Hirst (27) in 1942 beschreven. De belangrijkste resultaten van dit met influenzavirus verrichte onderzoek zijn:

1. Haemagglutinatie impliceert adsorptie van virus aan de erythrocyten; na daaropvolgende sedimentatie van de rode bloedlichaampjes blijkt de bovenstaande vloeistof haar agglutinerende werking te hebben verloren.
2. Adsorptie van virus aan erythrocyten vindt plaats aan bepaalde „receptor-plekken" van de erythrocytenwand; de graad van adsorptie is afhankelijk van de temperatuur. Hoe lager de temperatuur, hoe langer het duurt voordat alle virusdeeltjes zijn geadsorbeerd; de tijd, waarna maximale adsorptie heeft plaats gehad is voor 4°C. 5 uur, voor 27°C. 25 minuten en voor 37°C. 3 - 5 minuten.
   Het multivalente virus vormt „bruggen" tussen de erythrocyten, met als gevolg samenklontering.
3. Na enige tijd treedt dissociatie van het virus-erythrocyten-complex (elutie van het virus) op. Ook de snelheid van de elutie is afhankelijk van de temperatuur; deze is bij 4°C. gering (minder dan 1% van het geadsorbeerde agglutinine elueert in 18 uur), bij kamertemperatuur blijkt de snelheid van elutie te zijn toegenomen (25% elueert in 6 uur) en bij 37°C. nog meer (elutie compleet binnen 6 uur).
   De adsorptie-elutie-cyclus kan door het virusdeeltje een aantal malen worden volbracht, zonder dat het aan activiteit inboet.
4. Elutie van het virus gaat gepaard met destructie of inactivatie van de „receptor-plekken" op het erythrocytenoppervlak; de achtergebleven erythrocyten zijn niet langer in staat influenzavirus te adsorberen.

Hirst (27) interpreteerde deze opeenvolging van verschijnselen als een enzym-substraat-interactie. Het virus zou als intrinsiek bestanddeel een enzym bevatten, dat tijdens de aanhechting (adsorptie-fase) aan bepaalde celreceptoren (mucoproteinen),

deze irreversibel kan inactiveren en dat hierbij zonder aan activiteit in te boeten vrijkomt (elutie-fase).

De hypothese werd door Burnet en medewerkers (28, 28a, 29) en vele anderen geverifieerd; een volledige opheldering omtrent de aard van de enzymwerking werd door Gottschalk (30) gegeven. In zeer verkorte vorm volgt hieronder een overzicht van de belangrijkste onderzoekingen, welke het haemagglutinatie probleem betreffen.

Briody (31) en Hirst (32) toonden aan, dat influenzavirus, na voorafgegane warmtebehandeling gedurende 30 minuten op 50 - 56°C., nog wel aan de erythrocyten adsorbeert, doch niet langer in staat is zich er spontaan van los te maken; de enzymwerking is blijkbaar vernietigd (indicator-virus).

Een enzym met overeenkomstige eigenschappen als het virusenzym, werd door Burnet en medewerkers (33) en McCrea (34) aangetroffen in de cultuurfiltraten van *Vibrio cholerae* en *Clostridium welchii*. Het enzym werd door Burnet en medewerkers (33) het „receptor destroying enzym" genoemd, aangezien het, evenals het influenzavirus, in staat is erythrocyten zodanig te veranderen dat zij niet langer geagglutineerd kunnen worden door het influenzavirus (receptor-destructie).

De voor de virusenzymwerking gevoelige receptor-substantie wordt niet alleen aan het oppervlak van de erythrocyt aangetroffen, doch bevindt zich ook in grote hoeveelheden in normaal mensenserum (Francis inhibitor). Francis (35) toonde aan, dat haemagglutinatie door indicator-virus (influenza B) tot een hoge titer door normaal serum wordt geremd; de agglutinatieremmende werking gaat verloren, indien het serum met actief virus of met „receptor destroying enzym" (RDE) wordt vóórbehandeld (36).

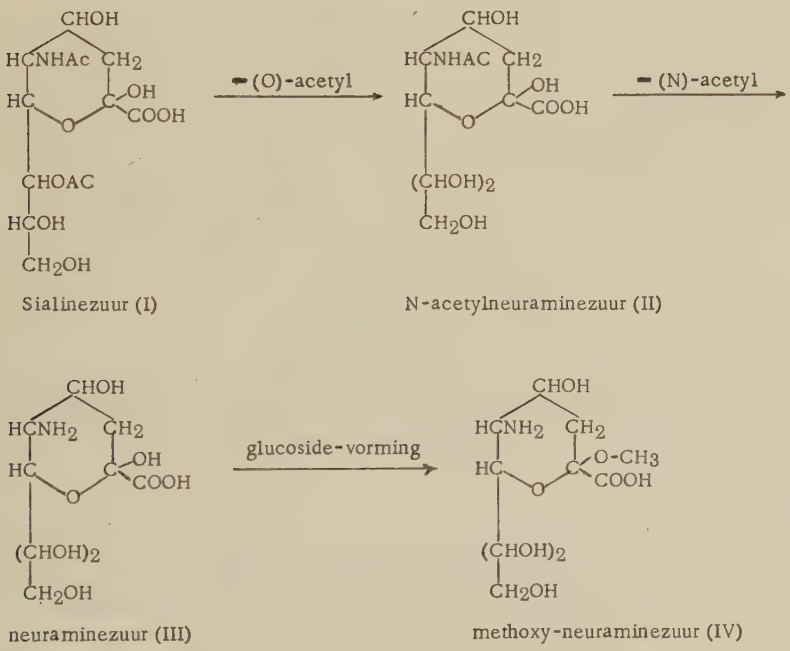
Behalve in normaal serum worden agglutinatieremmende substanties (inhibitoren, remstoffen) ook aangetroffen in talrijke afscheidingen van dierlijke en plantaardige oorsprong, zoals meconium, melk, urine, ovariumcyste slijm, cervix slijm, mucinen uit de tractus respiratorius, mucinen uit de glandulae submaxillares van schapen en runderen, in eiwit, allantoisvocht en chorioallantois membraan van bebroede kippeneieren, in erythrocyten-stroma, in plantenslijm etc. (28, 28a, 29, 37, 37a). Ook voor het bofvirus worden remstoffen in genoemde vloeistoffen en afscheidingen aangetroffen (vgl. 5; 38, 121).

Al deze stoffen bezitten een mucoproteine karakter en kunnen dienst doen als substraat voor de enzymreactie. In de agglutinatie-inhibitie proeven (zie Hoofdstuk III, C, 3.) concurreren de mucinen met de celreceptoren om het indicatorvirus; aangezien de mucinen vóór de erythrocyten aan het virus worden toegevoegd en het aan de mucoiden gehechte virus hiervan niet kan elueren, zal haemagglutinatie achterwege blijven. Zowel de celreceptoren als de oplosbare mucinen worden door inwerking van het virusenzym en RDE biologisch onwerkzaam gemaakt. Gottschalk en Lind (39, 40) en Gottschalk (41) toonden aan, dat gedurende de inactivering van de mucinen (ovomucine en urine mucoproteine) door actief influenzavirus of RDE, een laag-moleculaire verbinding wordt

vrij gemaakt („split-product"). Het „split-product" komt wat chemische eigenschappen betreft in grote trekken overeen met een door Blix in 1936 (42) uit bovine speekselklier-mucine geïsoleerde verbinding, die later sialinezuur werd genoemd (43). Het sialinezuur bevat twee acetylgroepen; de waarschijnlijke samenstelling is $C_{13}H_{21}O_{10}N$ (zie schema 1, I).

Klenk en medewerkers (44, 45) isoleerden kort hierna uit mucoproteinen een methoxyderivaat van neuraminezuur, $C_{11}H_{21}O_9N$ en N-acetyl neuraminezuur, $C_{12}H_{21}O_{10}N$ (zie schema 1, II, IV). Beide verbindingen tonen in chemisch gedrag grote overeenkomst met het sialinezuur (I) – zij verschillen hiervan door het ontbreken van resp. 2 en 1 acetylgroep – en met het „split-product". Deze laatste verbinding werd tenslotte door Klenk en medewerkers (46) als N-acetyl neuraminezuur geïdentificeerd.

Uit deze en andere gegevens (47, 48) kan worden afgeleid, dat neuraminezuur (zie schema 1, III) in de vorm van een mono- of diacetyl-derivaat (sialinezuur) het product is, dat door inwerking van het virusenzym uit mucoproteinen en glycolipiden wordt vrijgemaakt.



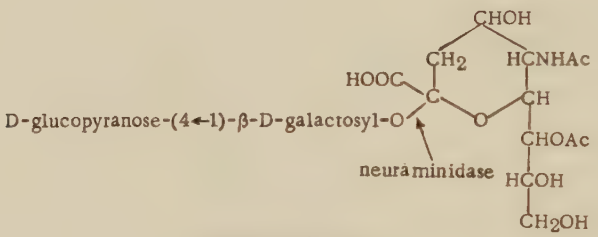
Schema 1

Neuraminezuur zelf remt de haemagglutinatie niet; uit een door Bogoch (48) verricht onderzoek naar de werkzaamheid van splitsingsproducten van een macromoleculaire glycolipide (hersenganglioside) kan worden afgeleid, dat het neuraminezuur-

hexosamine deel essentieel is voor de remming. Het complex, dat eveneens in mucoproteinen voorkomt, kan volgens de auteur dienst doen als aanhechtingspunt voor het virusenzym. Na afsplitsing van het neuraminezuur komt het virus in contact met het hexosamine-residue, hetgeen in analogie met het bij de bacteriophaag geconstateerde verschijnsel, het vrijkomen van nucleinezuur zou induceren.

Dat bij de afsplitsing van neuraminezuur tevens aminozuren en laag moleculaire peptiden worden vrijgemaakt (49, 50, 51), zou erop wijzen, dat voor enzymwerking ook de aanwezigheid van aan het neuraminezuur gekoppelde polypeptiden vereist is (50, 51).

Uit onderzoekingen naar de binding van neuraminezuur aan mucoproteinen blijkt (47, 52, 53), dat de suikerrest glucosidisch gebonden is aan het αC-atoom van het neuraminezuur (zie schema 2). De werking van het virusenzym, dat volgens Gottschalk en Perry (54) een intrinsiek bestanddeel vormt van het influenzavirus deeltje, is gekenmerkt door hydrolytische splitsing van deze binding. Het enzym is door Gottschalk (47) *neuraminidase* genoemd; eenzelfde enzym zou ook aanwezig zijn in het bofvirus en New Castle Disease virus (28, 55).



Neuramine-lactose

Schema 2

De aanwezigheid van het voor de enzymwerking zo belangrijke neuraminezuur kon door een aantal auteurs in biologisch materiaal van verschillende herkomst worden geconstateerd (49, 50, 51, 56 en 57).

Overeenkomstige verschijnselen als bij de erythrocyten doen zich voor bij de gastheercellen van het influenzavirus (58). Ook hier vindt men n.l. in de wand de mucoproteinen, waaraan het virus zich kan hechten (26). Behandeling van de cellen met RDE verhindert virusadsorptie (59, 60, 61). Om elutie te doen optreden is het evenwel vereist de cellen eerst te doden, bijv. met formaline.

De mogelijke relatie tussen enzym-receptor-(enzym-substraat) interactie en virusreproductie, is nog niet geheel duidelijk. Bekend is, dat virusinfectie van het chorioallantois membraan gepaard gaat met destructie van de receptor-substantie en wel speciaal gedurende de tijd, dat het ontstaan van nieuwe virusdeeltjes

kan worden aangetoond (62, 63). De receptor-destructie, die ongetwijfeld ook plaats vindt bij de adsorptie van virus aan de gastheercel, kan mogelijk door de te grove proeftechniek aan de aandacht zijn ontsnapt (64). Bovendien is bekend, dat regeneratie van de celreceptoren optreedt (60).

Ook Wolff (65) constateerde tijdens de reproductiecyclus van het influenzavirus in de epitheelcellen van de muizenlong een constante afname van het glycoproteine-gehalte van de geinfecteerde cel, waarschijnlijk onder invloed van de werking van het virusenzym.

Hoyle (66) en Schlesinger en Karr (63) nemen aan, dat de enzym-substraat-interactie geassocieerd is met de synthese van nieuwe virusdeeltjes; receptor-destructie blijkt n.l. plaats te vinden gedurende de reproductie-fase van het virus en niet tijdens het vrijkomen ervan (63).

Dat aanwezigheid van het vermogen tot enzymwerking niet vereist is voor het binnendringen van het virusdeeltje in de cel, werd door Fazekas de St. Groth bewezen (67, 68). Deze onderzoeker toonde aan, dat ook door verhitting geinactiveerd virus (enzymwerking verloren gegaan) de cel kan binnendringen. Ook Wolff (65) kwam langs geheel andere wegen tot dezelfde conclusie.

In tegenstelling tot Schlesinger en Karr (63) nemen Ackermann en Francis (69) aan, dat de functie van het virusenzym is „to fascilitate the escape of viral progeny from the surface of the defunct cell".

Burnet (28, 28a) tenslotte vermoedt, dat de enzymfunctie van het virus essentieel is bij de penetratie van het virus in cellen, die met een ongewoon grote hoeveelheid receptor-mucoproteine zijn bedekt (cellen van de ademhalingswegen van de mens).

Het aan het bofvirus eigen vermogen tot haemagglutinatie werd voor het eerst door Levens en Enders (9) aan het amnionvocht van met bofvirus besmette eieren waargenomen. Het agglutinatie-verschijnsel werd oorspronkelijk aan een suspensie van kippenerythrocyten geconstateerd; later bleek, dat ook de rode bloedlichaampjes van andere diersoorten (cavia's, duiven, schapen) en menserythrocyten, door het bofvirus worden geagglutineerd (38).

Evenals bij het influenzavirus, is haemagglutinatie door bofvirus het gevolg van adsorptie van virus aan de erythrocyten. De adsorptie zou gevolgd worden door elutie, die zeer langzaam verloopt en eerst volledig is na $3\frac{1}{2}$ uur bij 37°C. en soms gepaard gaat met haemolyse van de erythrocyten (38). Na elutie van het virus blijken de erythrocyten niet langer agglutinabel voor het bofvirus (38, 70, 71); de cellen zijn daarentegen nog wel gevoelig voor agglutinatie door het New Castle Disease virus en het influenzavirus. Worden de erythrocyten eerst met laatstgenoemde virussen behandeld, dan treedt geen agglutinatie meer op met bofvirus (33, 72). In de door Burnet en medewerkers (33) op basis van deze verschijnselen opgestelde virusreeks is de volgorde zodanig, dat

wanneer erythrocyten inagglutinabel zijn geworden voor een bepaald virus, de cellen niet meer geagglutineerd kunnen worden door virussen, welke in de rij aan het betreffende virus voorafgaan, maar nog wel door er op volgende virussen (receptor gradient). De volgorde van de reeks is: bof, New Castle Disease, influenza A, influenza C, influenza B, „fowl plague".

Soms blijkt het niet mogelijk het geadsorbeerde bofvirus volledig van de erythrocyten te verwijderen, zelfs niet na behandeling met immuun serum (70, 73). Burnet (70) neemt aan, dat sommige virusdeeltjes zich irreversibel aan de erythrocyt hechten. Ook bij het New Castle Disease virus treedt irreversibele adsorptie tussen virus en erythrocyt op (74). In tegenstelling tot normale adsorptie is het irreversibel gebonden virus ook niet met behulp van RDE van de erythrocyt te scheiden (74). Voor beide virussen blijkt irreversibele adsorptie slechts bij een temperatuur van 28°C. of hoger op te treden (70, 75). Dergelijke met virus bedekte, stabiele, d.w.z. onderling niet geagglutineerde cellen bezitten een aantal bijzondere eigenschappen, zoals het vermogen verse erythrocyten te agglutineren, mucoid-remstof te inactiveren, terwijl zij door toevoegen van anti-serum onderling kunnen worden geagglutineerd.

De zojuist beschreven verschijnselen bij het bof- en New Castle Disease-virus kunnen ten dele worden verklaard door de aanwezigheid van een enzym, dat in werking analoog zou zijn aan dat van het influenzavirus. Het vermogen tot irreversibele adsorptie aan en haemolyse van de erythrocyten, dat eveneens voor beide virussen werd geconstateerd, is moeilijker door de activiteit van bovenvermeld enzym te verklaren.

Uit het onderzoek van Morgan en medewerkers (76 - 79a) is gebleken, dat de haemolyserende, evenals de eluerende factor van het bofvirus in hun gedrag veel overeenkomst vertonen met een enzym (inactivering door verhitting gedurende 10 minuten op 50°C., toename van het effect bij verhoging van de temperatuur, inactivering door U.V.-licht en formaldehyde, invloed van de pH enz.). Toch zouden beide verschijnselen bij het bofvirus (78) en bij New Castle Disease virus (80, 81) geen identieke processen zijn.

In tegenstelling tot elutie is het verschijnsel van irreversibele adsorptie bij bof- en New Castle Disease-virus waarschijnlijk wèl geassocieerd met de haemolytische activiteiten van de virussen (82, 83, vgl. 4). Het is mogelijk, dat door de irreversibele adsorptie het virus-erythrocyten-complex voldoende lang bijeen blijft om ook het haemolyse-proces te doen plaats vinden (81).

Behalve door de beschreven haemagglutinerende en haemolyserende eigenschappen kan het bofvirus voorts nog met behulp van de complement bindingsreactie worden aangetoond; het virus blijkt uit verschillende specifiek reagerende stoffen (v en s antigeen) te bestaan (84, 85).

F. *Reproductie van influenza- en bof-virus in de gastheercellen*

Influenzavirus is niet in staat de erythrocyt binnen te dringen en daarin vervolgens het reproductieproces in te leiden. Uit de reacties tussen virus en rode bloedlichaampje kan evenwel toch in bepaalde opzichten een beeld worden verkregen over hetgeen zich gedurende de eerste stadia van de viruspenetratie in de gastheercel afspeelt. Men onderscheidt twee stadia:

1. Hechting van virus aan de celreceptor; uit het onderzoek van Davenport en Horsfall (86) en anderen (87 - 89) volgt, dat de adsorptie van het virus aan de erythrocyt sterk afhankelijk is van het type kationen en van de concentratie waarin deze in het milieu voorkomen. Ook de aanhechting van New Castle Disease virus aan erythrocyten (80, 81) en aan gastheercellen (kippenembryocellen, „in vitro"-proef) vereist de aanwezigheid van 0,15 Mol.-NaCl (90, 91). Uit een groot aantal onderzoekingen (vgl. 92) blijkt, dat de initiële binding tussen virus en erythrocyt en waarschijnlijk ook tussen virus en gastheercel electrostatisch is bepaald.
2. De eigenlijke infectie van de gastheercel door het virusdeeltje; kort na adsorptie (1 uur) „verdwijnt" het virus uit de receptorlaag van de cellen en is gedurende 2 - 4 uur, op een geringe fractie na, met behulp van geen enkele techniek (infectie-, haemagglutinatie- en complementbindings-test) in celsuspensies aan te tonen (eclips-fase, „dark period"). Om de tweede stap te doen plaats vinden, is celreceptor-destructie niet vereist, aangezien ook door verhitting geinactiveerd virus (65, 67) de cellen kan binnen dringen. De penetratie kan worden verhinderd, door de cellen te doden met formaline (67); het is waarschijnlijk, dat deze stap actieve deelneming van de cel vereist. Fazekas de St. Groth (67) neemt aan, dat cellen in staat zijn virusdeeltjes op dezelfde wijze als andere colloidale deeltjes in zich op te nemen. Het proces wordt door de onderzoeker „viropexis" genoemd.

De op de adsorptie en penetratie volgende desintegratie van virusproteine luidt de eclips-fase in; in hoeverre de desintegratie het gevolg is van enzymactiviteiten van de cel, is niet bekend.

Essentiële verschijnselen van de virusreproductie in bacterie, plantaardige en dierlijke cel zouden volgens Horsfall en Tamm (93) enige overeenkomst vertonen. Bij de T-bacteriophaag van *Escherichia coli*, waarvan de reproductie-cyclus uitvoerig is bestudeerd, treedt na adsorptie scheiding op tussen genetisch actief (nucleinezuur) en niet actief (eiwit-component) virusmateriaal, waarbij alleen het phaagnucleinezuur de cel binnendringt en aanleiding geeft tot de vorming van nieuwe phaagdeeltjes (94).

Recente onderzoekingen aan plantenvirussen doen vermoeden, dat ook bij de reproductie van deze virussen soortgelijke verschijnselen optreden (95).

Of ook bij dierlijke virussen sprake is van een dergelijk reproductiemechanisme is nog niet overtuigend bewezen. De hypo-

these van Hoyle (66) en Burnet (16, 96, 97), dat influenzavirus na adsorptie uiteenvalt in kleinere subeenheden, die tot onafhankelijke reproductie in staat zijn, zou door recent onderzoek van Hoyle en medewerkers (98 - 103) met radioactief gemaakte virusdeeltjes worden ondersteund.

Met de resultaten van de proeven zou het verschijnsel kunnen worden verklaard, dat optreedt, wanneer eieren met een sterk virusinoculum worden besmet en waarbij aan het einde van de eclips-fase (3 - 5 uur na virusadsorptie) éérst antigene (complementbindende), vervolgens haemagglutinerende (HA) en tenslotte 5 - 6 uur na begin van de infectie de infectieuze eigenschappen van het virusdeeltje optreden (66).

Na de latente periode, die bij influenzavirus in het bebroede kippenei ongeveer 3 uur, voor het bofvirus daarentegen onder dezelfde omstandigheden 30 uur duurt (93, 104), verschijnen de nieuwe virusdeeltjes het eerst in het membraan en vervolgens in het allantoisvocht. Uit onderzoekingen is gebleken (vgl. 93; 104), dat het aantal nieuw gevormde virusdeeltjes gedurende een aantal uren (bij snelle virusproductie) of een aantal dagen (bij langzaam verlopende virusreproductie) toeneemt tot een maximale waarde is bereikt.

Gedurende deze periode van toename is de tijd, nodig om het aantal deeltjes te verdubbelen, voor influenzavirus ongeveer 45 minuten, voor bofvirus ongeveer 15 uur (93). De maximale virusopbrengst per chorioallantoiscel bij het bereiken van het „concentratie-plateau" is voor influenzavirus in de orde van 1000 virusdeeltjes, voor het bofvirus daarentegen slechts 50 deeltjes (93).

De reproductie van het bofvirus in bebroede kippeneieren werd door Beveridge en Lind (38) en anderen (20, 21, 105, 107) nader onderzocht. Nagegaan werd op welke wijze de verschillende eigenschappen van het virus (haemagglutinerende, complementbindende en infectieuze eigenschappen) met elkaar in verband staan. Beveridge en Lind (38) vonden reeds dat de agglutinatietiter van het allantois- en amnionvocht van met virus besmette eieren in direct verband staat met de complementbindingstiter van deze vloeistoffen; zij concludeerden hieruit, dat de haemagglutinatietiter een functie van de virusconcentratie is. Dat niet alle complementbindende activiteit op naam van het virusdeeltje mag worden geschreven, blijkt uit het onderzoek van Henle en medewerkers (84). Deze onderzoekers toonden aan, dat in een virussuspensie behalve elementair-lichaampjes (v-antigeen) ook nog andere, veel kleinere deeltjes aanwezig zijn, die in de complementbindingsreactie specifieke antigene eigenschappen hebben (s-antigeen).

Ginsberg en medewerkers (105, 106) bepaalden het verband tussen agglutinatie- en infectie-titer van allantoisvocht van met bofvirus besmette eieren. De onderzoekers constateerden, dat tijdens virusreproductie de infectietiter en de haemagglutinatietiter in gelijke mate toenamen; ook bij het ultracentrifugeren ble-

ken de genoemde titers zich overeenkomstig te gedragen. Deze feiten maken het volgens de onderzoekers zeer waarschijnlijk, dat haemagglutinatie door het virusdeeltje zelf wordt veroorzaakt. De agglutinatietechniek zou volgens de auteurs gebruikt mogen worden om de viruscoricentratie te meten.

Weil en medewerkers (20, 21), Ginsberg en Horsfall (106) en Lundbäck (107) onderzochten de factoren voor optimale virusreproductie in bebroede kippeneieren, zoals leeftijd van de eieren op het moment van inoculatie, incubatieperiode na virusenting en verdunning van het allantoisvocht, dat als inoculum wordt gebruikt.

De reproductie van bofvirus in geisoleerde weefselstukjes werd nagegaan door Weller en Enders (108), en anderen (109 - 112). Twee belangrijke celcultuur-technieken, die bij virusonderzoek in het algemeen worden toegepast, zijn de Maitland celsuspensiecultuur en de Carrel „roller-tube"-cultuur. Ook bij het bofvirus onderzoek is van genoemde methodieken, in enigszins gewijzigde vorm, gebruik gemaakt.

Zo slaagden Weller en Enders (108) er voor het eerst in, bofvirus te kweken in de Maitland celsuspensie-cultuur; de onderzoekers waren door het maken van subcultures in staat virusreproductie over een periode van 30 dagen te verkrijgen.

Burr en medewerkers (109) bepaalden de invloed van de ouderdom en de hoeveelheid weefsel (chorioallantois membraan) op de virusproductie (influenza) in de Maitland weefselsuspensie. Zij toonden aan, dat een hoeveelheid chorioallantois weefsel, afkomstig van 11 dagen oude kippeneieren, van tenminste 100 mg nat gewicht nodig was om reproduceerbare gegevens te verkrijgen. Onder deze voorwaarde vond reproductie van het bofvirus langzaam plaats; de virustoename gemeten aan de infectietiter verliep van $10^{-2,4}$ tot $10^{-4,5}$. De virusreproductie vond plaats ten koste van intracellulair materiaal en bleek onafhankelijk van de samenstelling van het cultuurmedium.

Ook Watson en Cheever (111) gingen na welk effect de hoeveelheid van het weefsel had op de reproductie van het bofvirus. Uit voorgaande onderzoekingen (110) was gebleken, dat virusinfectie van de weefselstukjes (Maitland weefselsuspensie) beperkt bleef tot die cellen, die aan de buitenzijde van de weefselfragmenten gelegen zijn. Vergroting van het totaal oppervlak van de weefselstukjes zou dus tot een verhoging van de virusproductie kunnen leiden. Een dergelijk verband werd evenwel niet gevonden; vermeerdering van de hoeveelheid weefsel had alleen als gevolg, dat de periode, waarin virusreproductie optrad, werd verlengd. Vermeerdering van de door de onderzoekers gebruikte bofvirusstam (in een ver gevorderde staat van ei-adaptatie) in weefselfragmenten, had geen effect op het uitgroeien van fibroblasten uit deze weefselstukjes, wanneer zij met de „plasma-clot" methode op deze eigenschap werden onderzocht. Reproductie van het bofvirus ging volgens de auteurs dan ook niet gepaard met cytopathogene verschijnselen.

Wolff (112) vermeldde virusreproductie in kleine stukjes chorioallantois membraan met behulp van een gewijzigde „roller-tube"-cultuur techniek. Het bleek, dat gedurende de eerste 4 - 5 uur de virusconcentratie in de weefselstukjes constant bleef en gelijk was aan die aan het begin. Tussen 5 - 14 uur kon geen virus worden aangetoond (eclips-fase), waarna van 14 - 17 uur een virusvermeerdering tot ongeveer dertig maal de oorspronkelijke hoeveelheid plaats vond. Hierop volgde van 17 - 24 uur een periode, waarin de virusconcentratie in de weefselstukjes constant bleef. Tijdens de proef trad geen weefselgroei op.

Bij de Maitland celsuspensie cultuur is er, hoewel Weller en Enders (108) opgeven dat sommige weefselfragmentjes 30 dagen in leven bleven en dat in een aantal gevallen weefselgroei werd geconstateerd, geen sprake van een weefselcultuur in strikte zin. Duidelijke celgroei daarentegen vindt plaats o.a. met behulp van de Carrel „roller-tube" methode. Bij toepassing van deze techniek slaagden Perry en medewerkers (113) erin bofvirus te kweken in een cultuur van epitheelcellen afkomstig van mensenhuid. Henle en medewerkers (114, 115, 116) vermelden, dat reproductie van het bofvirus, gepaard gaande met cytopathogene verschijnselen plaats vindt in een weefselcultuur van HeLa-cellen (menselijke kankercel) en in die van epitheelcellen van verschillende herkomst. Het bleek van belang, uit te gaan van een vers geisoleerde bofvirusstam. Een dergelijk virus is nog geheel in bezit van het vermogen om in de weefselculturen te reproduceren. Het bleek zelfs mogelijk directe isoleringen van het virus in de weefselkweken uit te voeren (115). In handen van deze onderzoekers was deze isoleringsmethode zelfs gevoeliger dan de oorspronkelijke eitechniek.

De door Coons en Kaplan (117, 118) ontwikkelde methode voor het in situ aantonen van volwassen virusdeeltjes (met behulp van met fluoresceine gemerkte antilichamen) in apenspeekselklieren werd door Watson (110, 110a) toegepast om bofvirus in kippenembryocellen (intacte eieren of weefselfragmenten van de Maitland celsuspensie-cultuur) te localiseren. In beide gevallen werd het antigeen in grootste concentratie aangetroffen in die cellen, die in direct contact waren geweest met virusmateriaal. In overeenstemming met Coons en medewerkers (118) werd het antigeen uitsluitend in het cytoplasma van de aangetaste cellen aangetroffen. In eieren trad de specifieke kleuring in het amnionmembraan reeds 1 - 2 dagen na virusenting op; het maximum (toename van aantal en grootte der granulae) werd na 4 - 6 dagen bereikt, waarna afname plaats vond (110 a). De onderzoekster wijst op het parallel verloop van de genoemde verschijnselen en de infectietiter van het amnionvocht. Celdesintegratie trad eerst laat in het infectieproces op en stond in geen verband met het vrijkomen van virus uit de geinfecteerde cel. De gegevens duidden er op, dat een cel in staat is over een lange periode virus te produceren en uit te scheiden. Het infectie-proces bleek zelf-limiterend, wat volgens de onderzoekster het gevolg was van het op den duur optreden van minder gevoelige cellen tijdens het ouder worden van de

kippenembryonen. Het feit, dat oudere kippenembryonen een afname van de gevoeligheid voor bofinfectie vertonen (20, 21) zou hiermee in goede overeenstemming zijn. Als gevolg van de bofinfectie treden geen direct of microscopisch zichtbare laesies in het kippenembryo op (110 a).

Deze gegevens en die van Coons en Kaplan (118) zijn in goede overeenstemming met de resultaten van het door Johnson en Goodpasture (119) verrichte onderzoek naar de histopathologie van de geinfecteerde apenklier.

G. *Remming van de bofvirus reproductie*

Een aantal stoffen blijkt in staat de reproductie van het bofvirus in bebroede kippeneieren (105, 106, 120-130) of in celsuspensie culturen (122, 130-134) te vertragen of geheel te remmen.

Voor de volgende verbindingen is activiteit t. o. v. het bofvirus vermeld.

Aminozuren en peptiden:
arginine (132)
lysine (l en dl) (132)
ornithine (132)
threo-β-phenylserine (130)
poly-l-lysine (125)
poly-d-lysine (128)

Metaboliet-antagonisten:
oxythiamine (134)
deoxypyridoxine (134)
di- en tri-chloor-ribofuranosylbenzimidazool (127)

Acridines:
nitro- en chloor-acridine (123)

Diamidines:
pentamidine (124, 131, 133)
stilbamidine (124, 131, 133)

Dicarbonyl-verbindingen:
β-aethoxy-α-ketobutyraldehyde (129)

Poly-electrolyten:
polyvinylamine (126)

Polysacchariden:

Een drietal, in chemisch opzicht onbekende polysacchariden uit de kapsels van Friedländer bacterie (105, 106, 120-122).

Met uitzondering van de drie laatstgenoemde stoffen zijn alle verbindingen eveneens werkzaam op influenzavirus (A en B).

De wijze, waarop de virusremmende werking tot stand komt, is nog slechts oppervlakkig bekend. Zij kan het gevolg zijn van een inactiverend effect van de stof op extracellulair virus (123, 129), of op intracellulaire virusdeeltjes, virusfragmenten of tussenproducten van de virus-synthese (125, 130, 133, 134). Ook is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat onder invloed van de stoffen het cel-metabolisme zodanig wordt veranderd, dat normale virussynthese achterwege blijft (123, 133). Van een aantal dezer stof-

fen is bekend, dat zij de werking van bepaalde enzymen (ademhalingsenzymen) remmen.

Een aantal stoffen werd in virusremmende concentraties getest op hun invloed op de ademhaling, het glucose-verbruik of de groeipotentie van het weefsel (123, 132-135). In het merendeel van de gevallen trad bij minimale werkingsdosis géén, of een gering cytotoxisch effect op.

Van enige stoffen is bekend, dat zij de haemagglutinatie of haemolyse door het bofvirus remmen. Zo toonde Dunham (136) aan, dat chlorophyl de haemagglutinatie door het bof-, influenza-A en New Castle Disease-virus verhindert (de stof remt eveneens de werking van het enzym hyaluronidase). Gardner en Morgan (137) vermelden, dat hydroxylamine-hydrochloride en urethaan in staat zijn de haemolyse door het bofvirus te remmen, op de haemagglutinatie evenwel geen invloed te hebben. Cysteine daarentegen blijkt de haemolyserende en haemagglutinerende werking te verhogen terwijl glutathion eerstgenoemd effect remt en het tweede stimuleert. De stoffen, die werkzaam zijn tegen het bof-haemolysine, bezitten tevens een inactiverende werking op het eveneens als haemolytisch agens werkzame enzym lecithinase A (137). Morimoto en Morgan (138) tenslotte toonden aan, dat cholesterol, lecithine en cardiolipine de haemolyse door het bofvirus voorkomen; de stoffen hebben daarentegen geen effect op de haemagglutinatie. Cholesterol en lecithine zijn bestanddelen van de erythrocytenwand. Dat dit evenwel niet een specificiteit van het remmend effect door genoemde stoffen oplevert, blijkt uit het feit, dat ook cardiolipine een overeenkomstige eigenschap vertoont. Het is volgens de onderzoekers waarschijnlijk, dat de stoffen zich in het reactiemedium aan het bofhaemolysine hechten, zodat de mogelijkheid tot aantasten van de erythrocytenwand wordt uitgesloten. Is het virus eenmaal aan de erythrocyt geadsorbeerd, dan treedt haemolyse ook in aanwezigheid van de stoffen normaal op.

De mogelijkheid virusinfecties in het laboratorium („in vitro" proeven) met behulp van chemische verbindingen met succes te bestrijden, staat in scherp contrast tot de resultaten „in vivo". Pogingen om bof met antibiotica, zoals aureomycine, chloromycetine en terramycine (139-144) sneller te doen genezen, boekten slechts twijfelachtig succes. Diaethylstilbestrol en corticotropine zouden enige waarde als prophylaxe, resp. als therapeuticum bezitten (145-148).

Het ontbreken van elk effect van antibiotica tegen de ziekte bof („in vivo") is in overeenstemming met de waarneming, dat penicilline en streptomycine „in vitro" evenmin in staat zijn de virusproductie te beinvloeden (20, 21). Van genoemde antibiotica wordt dan ook in laboratoriumproeven een dankbaar gebruik gemaakt om bacteriële infectie in eieren of weefselculturen, die met bofvirus zijn besmet, te verhinderen.

Voor uitgebreide literatuuroverzichten betreffende chemotherapie van virusinfecties wordt verwezen naar de nummers 93 en 149-151 van de literatuurlijst.

Hoofdstuk III

MATERIAAL EN METHODEN

A. *Enkele opmerkingen uit de literatuur betreffende het gebruik van bebroede kippeneieren in het virusonderzoek*

Voor experimenteel onderzoek op het gebied van virusziekten is het van het grootste belang, dat beschikt kan worden over een proefobject, dat de volgende eigenschappen bezit (152):

1. gemakkelijk door het betreffende virus te kunnen worden geïnfecteerd,
2. zodanig op virusinfectie te reageren, dat door het optreden van duidelijke symptomen of veranderingen geconstateerd kan worden, dat virusvermeerdering heeft plaats gehad,
3. gemakkelijk in grote hoeveelheden en met betrekkelijk lage kosten te verkrijgen.

Het bebroede kippenei blijkt aan de genoemde eisen te voldoen; de bruikbaarheid ervan voor onderzoekingen naar het gedrag van virussen wordt nog verhoogd door aanwezigheid van een aantal „extra-embryonale" organen, zoals amnion- en allantoisholte en dooierzak, welke omkleed worden door slechts uit enkele cellagen bestaande membranen, die de „voedingsbodem" voor het virus vormen. Tegenover deze voordelen kan als nadeel worden aangevoerd, dat in verband met de gevoeligheid van het ei voor bacteriële infecties hoge eisen aan de steriliteit van het inoculum moeten worden gesteld.

In figuur 2 zijn de voornaamste organen en holtes van een 11-dagen oud kippenei afgebeeld.

Voor een uitvoerige beschrijving van de techniek voor virusenting wordt verwezen naar Woodruff en Goodpasture (152 a), Enders en Levens (23), van Rooyen en Rhodes (5) en Rivers (6).

De sterfte van de eieren na de injectie-manipulatie is meestal gering; ook de sterfte door bacteriële infectie kan, door toediening van antibiotica, zoals penicilline en streptomycine, die geen invloed op de virusvermeerdering hebben, tot een minimum worden beperkt. Doch ondanks dit alles, gaat bij proeven steeds een zeker percentage eieren verloren (25-50%). Enders en Levens (23) vermoeden, dat deze sterfte het gevolg is van de vermeerdering van het virus. Beveridge (153) echter vermeldt, dat ook niet geïnoculeerde eieren in een verhoogd percentage sterven, indien zij na lang (6 - 9 dagen) in horizontale positie zijn bebroed, 180° worden gedraaid; het embryo bevindt zich dan aan de onderzijde en doordat het een geringer s.g. heeft dan zijn omgeving, stijgt het naar boven en trekt het chorioallantois membraan los van de eischaal.

1. embryo; 2. amnionholte; 3. ductus umbilicus; 4. amnionvlies; 5. dooierzak; 6. eiwit; 7. allantoisholte; 8. chorioallantois membraan, bestaande uit een ectodermaal chorion en een entodermaal allantois, tussen beide lagen bevindt zich mesoderm, waarin een groot aantal bloedvaten; 9. eischaal membraan; 10. luchtkamer; 11. eischaal; 12. extra embryonale lichaamsholte (in werkelijkheid geen echte, doch een potentiele ruimte). Op de 13e incubatiedag bevat de allantoisholte ca 5 cc, de amnionholte ca 1 cc vocht.

Figuur 2
Diagram van een 11 dagen oud bebroed kippenei.
(Th. M. Rivers, Viral and Rickettsial Infections of Man, 1952)

Het bofvirus kan op verschillende, hieronder weergegeven manieren in het ei worden gebracht:

a. Enting in de amnionholte. Deze wijze van besmetten is waarschijnlijk de meest gevoelige en kan worden gebruikt om virus te isoleren uit speeksel of speekselkliersuspensie (vgl. 5), of uit cerebrospinaalvocht (11, 154).
b. Enting in de allantoisholte. Deze methode wordt het meest gebruikt, doch belooft alleen voor een aan het ei geadapteerde bofvirusstam goede resultaten (vgl. 5).
c. Enting in de dooierzak. Behalve in de dooiersuspensie kan het virus bij oogsten (6 - 7 dagen na enting) ook in grote hoeveelheden worden aangetroffen in het amnionvocht (vgl. 5).

Overdracht van virus naar andere eieren is mogelijk met een dooiersuspensie, amnion- en chorioallantois-membraan-suspensie en amnion- en allantoisvocht.

De vermeerdering van het virus in het ei werd bij deze onderzoekingen aanvankelijk met behulp van de complementbindingstest, later aan de hand van het haemagglutinerende vermogen van het virus bepaald.

B. *Materiaal*

Glaswerk. De dikwandige glazen rolcultuurbuisjes met ronde bodem (Pyrexglas) werden gedurende 1 - 1½ uur uitgekookt in gedestilleerd water, waaraan een kleine hoeveelheid T-pol („Presto") was toegevoegd. Na wassen van de buisjes in leidingwater en spoelen in gedestilleerd water werden zij met een wattenprop gesloten en gedurende 20 minuten bij 110 - 120°C. nat gesteriliseerd.

Eén-cc (1/100) pipetten werden gedurende 1½ - 2 uur gespoeld met leidingwater in een spe-

ciale pipettenspoeler; de pipetten werden vervolgens gedurende enige tijd bij 37°C. gedroogd, waarna zij in een koperen trommel gedurende 2 uur bij 160°C. droog werden gesteriliseerd.

Vijf-cc pipetten, Pasteurpipetten, Petrischalen, mortieren enz. werden na reiniging (huishoudelijk schoon) in zijdepapier ingepakt en op bovenbeschreven wijze droog gesteriliseerd.

De rubber stoppen van de rolcultuurbuisjes werden met de buisjes uitgekookt en gespoeld, waarna zij in een grote Petrischaal gedurende 20 minuten bij 110 - 120°C. nat werden gesteriliseerd.

Instrumenten. Het voor het vervaardigen van de vliesjes benodigde instrumentarium (schaartjes, pincetten, ponsapparaatje, haakjes voor overbrengen van de vliesjes) werden in een koperen doos bewaard, waarin zij op de bovenbeschreven wijze droog werden gesteriliseerd.

Eieren. Bevruchte witte eieren (Witte Leghorns), werden van de handel betrokken. De eieren werden op zodanige tijden besteld, dat zij binnen drie dagen konden worden benut. De eieren werden bebroed in „Reform" broedmachines bij een temperatuur van 38½ - 39½°C. in een vochtige (85% relatieve vochtigheid) atmosfeer.

Erythrocyten. De voor de haemagglutinatie benodigde erythrocyten waren van de op de dierenafdeling van het laboratorium gehouden kippen afkomstig; van vier kippen werd d.m.v. een hartpunctie per kip 6 cc bloed afgetapt. Het bloed werd door Alsever vloeistof (zie onder) - 2 cc vloeistof per 6 cc bloed - onstolbaar gemaakt. Het van de vier kippen afkomstige bloed werd verzameld, gedurende 15 minuten bij 1200 g. gecentrifugeerd teneinde het serum en Alsever vloeistof te verwijderen en vervolgens nog driemaal gewassen in physiologische zoutoplossing (centrifugeren gedurende 15 minuten bij 1200 g., afzuigen van bovenstaande vloeistof, daarna de erythrocyten opnieuw suspenderen in verse physiologische zoutoplossing en centrifugeren, enz.). De neergeslagen erythrocyten werden in een klein steriel flesje bewaard en niet langer dan een week voor de proeven gebruikt. Een enkele maal kwam het voor, dat de erythrocyten door verontreiniging in de agglutinatiebuisjes agglutineerden; om dergelijke erythrocyten te herkennen en te kunnen verwijderen werd de voor de proeven vervaardigde erythrocyten suspensie op een zodanig tijdstip in de agglutinatiebuisjes gebracht, dat op het moment van oogsten de erythrocyten waren uitgezakt en de buisjes met onspecifieke haemagglutinatie konden worden verwijderd, om door andere buisjes te worden vervangen.

Gebruikte vloeistoffen

Tyrode oplossing		Alsever vloeistof	
NaCl	8,00 gram	Na-citraat 2 H_2O	8,0 gram
KCl	0,20 gram	NaCl	4,2 gram
$CaCl_2$	0,20 gram	glucose	20,5 gram
$MgCl_2.6H_2O$	0,10 gram	aqua dest.	1000,0 cc
$NaH_2PO_4.H_2O$	0,05 gram	citroenzuur 10%	± 7,0 cc
$NaHCO_3$	1,00 gram		
glucose	1,00 gram	Physiologische zoutoplossing	
aqua dest.	1000,00 cc	NaCl	0,9% in aqua dest.

De Tyrode oplossing wordt gesteriliseerd met behulp van een Seitz (EK) bacteriefilter, de physiologische zoutoplossing en de Alsever vloeistof door verhitting gedurende 20 minuten bij 110 - 120°C. (natte sterilisatie). De pH van de Tyrode oplossing bedraagt 7,4 - 7,6, die van Alsever vloeistof en de physiologische zoutoplossing resp. 6,1 en 7,3.

Cultuurmedium. Dit bestond uit een 2% bovine albumine (Poviet) oplossing in Tyrode. Van het bovine albumine werd een 5% voorraadsoplossing in physiologische zoutoplossing gemaakt; deze werd door bovengenoemde Seitz bacteriefilter gefiltreerd en bewaard in een steriele fles, afgesloten met rubber stop.

Antibiotica. Teneinde bacteriële infectie van het cultuurmedium en de eieren te voorkomen, werden hieraan en aan de verdunningsvloeistoffen de antibiotica penicilline en streptomycine toegevoegd; de aangehouden concentraties bedroegen 0,4 cc 10.000 eenheden penicilline en 0,25 cc 1% dihydro-streptomycine oplossing per 10 cc vloeistof.

Te onderzoeken stoffen. Deze werden tot de gewenste concentraties opgelost in de benodigde hoeveelheden Tyrode oplossing; na bepaling van de pH (Beckmann), werd de oplossing óf door een glasfilter (3 G 5 M, met poriewijdte van ± 1,6 μ) óf door een Seitz bacteriefilter gefiltreerd en tot gebruik bewaard in steriele flesjes, afgesloten met een rubber stop. Ook werd voor een aantal proeven, na oplossen van de stof en het op pH brengen van de oplossing, de bovine albumine hierin tot een concentratie van 2% opgelost, waarna filtratie plaats vond.

C. *Methodieken*

1. Bepaling van de infectietiter

Voor de quantitatieve bepaling van de hoeveelheid geproduceerd virus staan twee methoden ter beschikking, n.l. bepaling

van de infectietiter of bepaling van de haemagglutinatietiter van de te onderzoeken vloeistof of weefselsuspensie.

Hoewel Ginsberg en Horsfall in 1948 (Hoofdstuk II, F.) meenden te hebben aangetoond, dat de haemagglutinatietiter een even juiste maat voor de hoeveelheid geproduceerd virus is als de infectietiter, leek het ons tenslotte beter de veel gevoeliger infectietiter voor de uiteindelijke beoordeling van de virusreproductie te benutten, zulks mede op grond van recente onderzoekingen aan incompleet influenzavirus (vgl. Dulbecco, 155).

Deze techniek is gebaseerd op een „alles of niets" reactie van het proefdier op virusinfectie; de reactie is voor de groep der Myxovirussen de productie van haemagglutininen.

Bij de bepaling van de infectietiter wordt nagegaan bij welke verdunning van het te onderzoeken materiaal in 50% van de geënte eieren het virus tot vermeerdering komt, hetgeen door de aanwezigheid van haemagglutininen wordt geconstateerd.

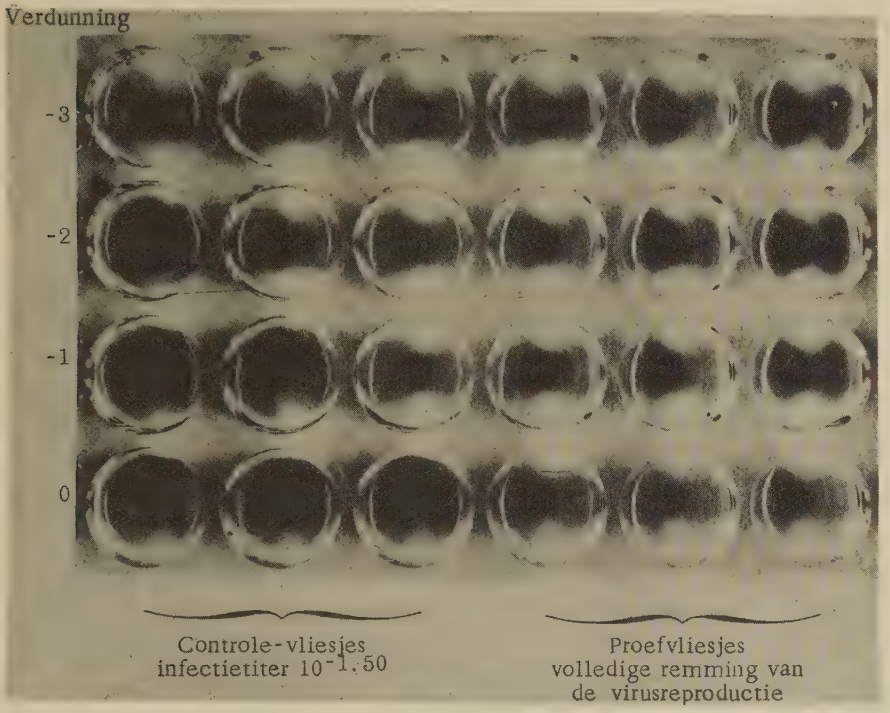
Het te onderzoeken materiaal wordt in physiologische zoutoplossing (met penicilline en streptomycine) verdund in stappen van tien, d.w.z. 0,1 cc van de virussuspensie wordt met een 1-cc pipet gebracht bij 0,9 cc physiologische zoutoplossing. Met een nieuwe 1-cc pipet wordt de vloeistof goed gemengd en 0,1 cc ervan overgebracht in 0,9 cc physiologische zoutoplossing, enz. In verband met de inactiverende werking van de physiologische zoutoplossing op het virus, worden direct hierna uit elke verdunning drie eieren geënt.

Van deze eieren is van te voren reeds de luchtkamer en de plaats van enting met potlood op de eischaal aangetekend. Na desinfectie van de eischaal met jodiumtinctuur worden met een tandartsboor twee gaatjes geboord, n.l. één in de schaal boven de allantoisholte en één op de plaats boven de luchtkamer; deze ruimten zijn te zien door de eieren te „schouwen". Het gaatje boven de luchtkamer is nodig voor het laten ontsnappen van de lucht.

Met een 1-cc tuberculine spuitje met fijne naald (nummer 17) wordt vervolgens van elke verdunning 0,1 cc per ei in de allantoisholte ingespoten te beginnen bij de sterkste verdunning. Na deze behandeling worden de gaatjes afgesloten met een druppel gesmolten paraffine, waarna de eieren in een broedstoof bij 35°C. verder worden bebroed.

Vier à vijf dagen later wordt aan de eieren een weinig allantoisvocht ontnomen (eieren worden „geoogst"). Zij worden daartoe eerst gedurende $1\frac{1}{2}$ - 2 uur gekoeld in de ijskast (4°C.). Daarna wordt de eischaal boven de luchtkamer met een pincet weggebroken, waarna steeds met een nieuwe Pasteurpipet een kleine hoeveelheid allantoisvocht uit elk ei wordt opgenomen (per ei ongeveer 4 druppels). Deze hoeveelheid allantoisvocht wordt vervolgens in een agglutinatiebuisje gebracht, waarin zich 0,5 cc 0,25% kippenerythrocyten suspensie (0,25 cc opeengepakte erythrocyten op 100 cc physiologische zoutoplossing) bevindt. De virus-erythrocyten suspensie blijft vervolgens gedurende $1\frac{1}{2}$ - 2 uur bij kamertemperatuur staan, waarna de proef kan worden „afgelezen", door van iedere verdunning te bepalen in hoeveel

eieren bofvirus tot vermeerdering is gekomen; het allantoisvocht van de positieve eieren agglutineert de kippenerythrocyten suspensie (zie figuur 3). De verdunning, waarbij 50% van de geinjiceerde eieren haemagglutinatie vertoont, wordt berekend volgens de methode var Reed en Muench (156); deze verdunning wordt als eind-resultaat van de bepaling (50% infectie punt, ID_{50}) aangehouden, daar dit punt op de dosis-reactie curve het meest nauwkeurig is af te lezen.



Figuur 3
Agglutinatie van kippenerythrocyten door bofvirus

Voor de berekening van dit punt gingen Reed en Muench (156) als volgt te werk:
Stel dat van een virussuspensie de infectietiter (ID_{50}) moet worden bepaald en dat deze is gelegen tussen de verdunningen 10^{-1} en 10^{-4}. Bij gebruik van 6 proefobjecten (eieren) per verdunning zou het resultaat als volgt kunnen zijn:

a	b	c	d totaal	e	f
virus verdunning	aantal pos.* eieren	aantal neg. eieren	aantal pos. eieren	aantal neg. eieren	% pos. eieren
10^{-1}	6	0	16	0	100
10^{-2}	5	1	10	1	91
10^{-3}	3	3	5	4	56
10^{-4}	2	4	2	8	20
10^{-5}	0	6	0	14	0

* positieve eieren zijn eieren, waarin virus tot ontwikkeling is gekomen.

Het percentage positieve eieren (kolom f) wordt nu berekend uit het totaal aantal positieve en negatieve eieren (kolom d en e). Reed en Muench nemen n.l. aan, dat eieren die bij een

bepaalde virusverdunning positief zijn, zeker óók een positieve reactie zouden geven indien zij met voorafgaande verdunningen zouden zijn geënt.

In ons geval mogen dus de twee eieren, die bij verdunning 10^{-4} positief zijn, opgeteld worden bij de drie positieve eieren van de verdunning 10^{-3} enz. (kolom d). Hetzelfde geldt voor de negatieve reacties, eieren, welke negatief zijn bij een lage virusverdunning, zullen dit ook zijn bij er op volgende, sterkere virusverdunningen. In ons geval wordt dus het ene ei, dat bij de verdunning 10^{-2} negatief is opgeteld bij de drie negatieve eieren van 10^{-3}, enz. (kolom e).

Het 50% infectie punt kan vervolgens grafisch (virusverdunningen uitgezet tegen totaal aantal positieve en negatieve eieren) of door interpolatie uit de aangrenzende verdunningen worden berekend. In ons onderzoek werd deze laatste methode steeds benut; voor het bovenbeschreven voorbeeld zou de infectietiter $10^{-3,17}$ zijn, immers het 50% infectie punt ligt tussen de verdunningen 10^{-3} en 10^{-4} en wel op een afstand die het (50-56)/(20-56) = 1/6 = 0,17 deel is van de afstand van 10^{-3} tot 10^{-4}. Aangezien het 50% infectie punt tussen 10^{-3} en 10^{-4} is gelegen, is de uitkomst: log 10^{-3} + 0,17 log 10 = - 3,17 log 10 of $10^{-3,17}$ (vgl. 5).

De infectietiter kan worden uitgedrukt in 50% infectie dosis eenheden per cc (ID_{50}/cc). Deze wordt als volgt berekend: stel de infectietiter van een bepaalde virussuspensie is $10^{-5,5}$ (bepaald op de bovenbeschreven wijze en berekend volgens Reed en Muench). Uit de definitie volgt, dat 0,1 cc van de $10^{-5,5}$ verdunning 1 ID_{50} bevat, of 0,1 cc $10^{-5,5}$ = 0,1 x 3,16 x x 10^{-6} cc = 1 ID_{50}. De onderzochte virussuspensie bevat nu 1/(0,1 x 3,16 x 10^{-6}) ID_{50}/cc = 3,2 x 10^{6} ID_{50}/cc (vgl. 156a).

Uit onderzoekingen van Donald en Isaacs (157) en Isaacs en Donald (158), zie hiervoor Isaacs (159), kan worden afgeleid, dat voor het bofvirus 1 ID_{50} overeenkomt met ongeveer 100 virusdeeltjes.

2. Bepaling van de haemagglutinatietiter

Wij volgden de werkwijze, zoals deze door Salk (160) werd beschreven (vgl. ook 23).

Met behulp van diens „pattern-test" is het mogelijk het haemagglutinerende vermogen van een virussuspensie quantitatief te meten. Opgemerkt dient te worden, dat de toepassingsvormen in de diverse laboratoria niet geheel gelijk zijn; de verschillen liggen vooral in het gehalte (dichtheid) van de gebruikte erythrocyten suspensie, de erythrocyten-„soort", de temperatuur en de pH waarbij de haemagglutinatie plaats vindt en tenslotte de criteria volgens welke het eindpunt van de haemagglutinatie wordt beoordeeld. Over het algemeen hebben de genoemde factoren bij het bofvirus – in tegenstelling tot het influenzavirus (161) – slechts een gering effect. Wel tonen erythrocyten afkomstig van verschillende kippen variatie in hun gevoeligheid voor agglutinatie (38, 107). Daarom werd voor een erythrocyten suspensie steeds uitgegaan van gepoold bloed van vier verschillende kippen. De techniek is als volgt:

Twaalf buisjes met holle bodem worden in een rekje geplaatst. Vanuit een 5-cc pipet worden alle buisjes voorzien van 0,5 cc physiologische zoutoplossing. Met een 1-cc pipet wordt vervolgens in het eerste buisje 0,5 cc van de te onderzoeken vloeistof gebracht. Met een automatische pipet wordt vanuit dit buisje - en zo vervolgens - 0,5 cc van het mengsel doorgevoerd door de overige buisjes, het laatste uitgezonderd (controle erythrocyten). Daarna wordt in elk buisje 0,5 cc 0,25% kippenerythrocyten suspensie gebracht. De buisjes blijven gedurende 1½ - 2 uur bij kamertemperatuur staan, waarna kan worden afgelezen tot welke verdunning haemagglutinatie is opgetreden. In de buisjes, waarin haemagglutinatie heeft plaats gevonden, hebben de erythrocyten de holle bodem geheel met een dunne film van samengeklonterde erythrocyten bedekt; in de buisjes, waarin zich geen haemagglutininen bevonden, zijn de erythrocyten tot een kleine, ronde, scherp omlijnde „button" uitgezakt, terwijl gedeeltelijke haemagglutinatie gekenmerkt wordt door een centrale „button", omgeven door een smalle zone van geagglutineerde erythrocyten (zie figuur 3).

De hoogste verdunning (vóór toevoeging van de erythrocyten suspensie), welke nog een duidelijke en volledige agglutinatie vertoont, wordt als eindpunt van de titratie aangehouden; de haemagglutinatietiter wordt opgegeven als de reciproke waarde van deze

verdunning. Per definitie bevat deze verdunning 1 HA-eenheid aan haemagglutinine.

3. Bepaling van de haemagglutinatie-inhibitie-titer

Deze techniek wordt toegepast ter bepaling van de haemagglutinatieremmende werking van antiserum (serumdiagnostiek) en van andere „neutralizerende" stoffen, zoals mucoproteinen (zie Hoofdstuk II, E.) en viricide stoffen (162). Voor een uitvoerige beschrijving van de serum inhibitie proeven wordt verwezen naar Enders en Levens (23) en Rivers (6).

De te onderzoeken vloeistof wordt op de wijze als onder III, C, 2. beschreven in 0,5 cc physiologische zoutoplossing verdund in stappen van twee. In elk verdunningsbuisje wordt vervolgens 0,5 cc 4 HA-eenheden (zie boven) bofvirus gebracht. Na het inbrengen van het virus wordt 0,5 cc 0,4% kippenerythrocyten suspensie aan de reeks verdunningsbuisjes toegevoegd.

Uit de resultaten wordt afgeleid, tot welke verdunning van de onderzochte stof (d.i. de verdunning van de stof, vóórdat virus- en erythrocyten-suspensie zijn toegevoegd) remming van de haemagglutinatie optreedt. De remmingscapaciteit wordt in de reciproke waarden van deze verdunningen uitgedrukt.

4. Rolcultuurtechniek

De gebruikte techniek werd door Wolff (112) ontwikkeld in een onderzoek naar de reproductie van bofvirus in geisoleerde stukjes chorioallantois membraan. De methode verschilt van de oorspronkelijke „roller-tube" techniek van Carrel in de wijze van aanbrengen van de weefselstukjes. Deze worden volgens laatstgenoemde techniek ingebed in een dunne laag plasma, aangebracht aan de binnenzijde van de cultuurbuizen. Na coagulatie van het plasma wordt cultuurmedium toegevoegd waarna de buizen worden afgesloten met een rubber stop. De buizen worden op een roterende schijf geplaatst (7 omwentelingen per minuut), die een enigszins naar achteren hellende stand inneemt. Op deze wijze is het mogelijk groei van weefsel over een lange periode te verkrijgen; het is evenwel noodzakelijk de cultuurvloeistof iedere 2-3 dagen te verversen (voor een uitvoerige beschrijving vgl. 6).

De door Wolff ontwikkelde rolcultuurtechniek, waarbij met overlevende weefselstukjes wordt gewerkt, is als volgt:

Van het chorioallantois membraan van een aantal 10 dagen oude kippeneieren wordt onder steriele condities (in een steriele kast) een groot aantal stukjes geknipt (ongeveer 6 mm^2) of, zoals in dit onderzoek, geponst (diameter ongeveer 8 mm). Het knippen wordt vergemakkelijkt door het te doen onder vloeistof; gewerkt werd in een grote Petrischaal (diameter 14 cm) gevuld met Tyrode oplossing. Voor het ponsen wordt het membraan gelegd op een stukje – van te voren gesteriliseerd – hardboard, waarna met een roestvrij stalen ponsapparaatje stukjes weefsel uit het membraan

worden geponst. De weefselstukjes worden met Tyrode oplossing goed gewassen en vervolgens met bofvirus besmet, door het weefsel gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur in een Petrischaal (diameter 10 cm) gevuld met 40 cc op 1/10 verdund, vers geoogst allantoisvocht (van met bofvirus besmette eieren) te houden.

Na afloop van de incubatie-periode worden de vliesjes in ruime hoeveelheid Tyrode oplossing gewassen teneinde het oppervlakkig geadsorbeerde virus te verwijderen, waarna zij volgens het toeval („at random") verdeeld in de rolcultuurbuisjes worden gebracht (in dit onderzoek 3 vliesjes per buisje).

De rolcultuurbuisjes (lengte ongeveer 7,5 cm, diameter ongeveer 1,5 cm) worden in de schijven van het rolcultuurapparaat geplaatst en afgesloten met een rubber stop. Vervolgens wordt per buisje 1 cc 2% bovine albumine oplossing (in Tyrode) gebracht en hieropvolgend de met bofvirus besmette weefselstukjes. Per proef- en controle-groep zijn steeds drie rolcultuurbuisjes gebruikt.

De vier schijven met de buisjes worden aan het rolcultuurapparaat bevestigd; de stand hiervan is zodanig, dat de schijven met een hoek van 5° achterover hellen. De assen worden door een motortje, dat zich buiten de stoof bevindt, via een buigbaar stalen asje in beweging gebracht; de schijven draaien met een geringe snelheid rond, ongeveer 1 omwenteling per 5 minuten. Per schijf kunnen 18 buisjes worden geplaatst, zodat met 72 buisjes tegelijk kan worden gewerkt. De broedstoof, waarin het rolcultuurapparaat is gemonteerd, wordt op 37°C. gehouden. Door de ronddraaiende beweging vindt een goede gasuitwisseling plaats tussen vloeistof- en gas-fase, terwijl op deze manier tegelijkertijd een opeenhoping van schadelijke afbraakproducten van het weefsel aan haar oppervlak wordt voorkomen. Ook na lange proefduur (23 uur) is door ons geen merkbare verlaging van de pH van het cultuurmedium geconstateerd.

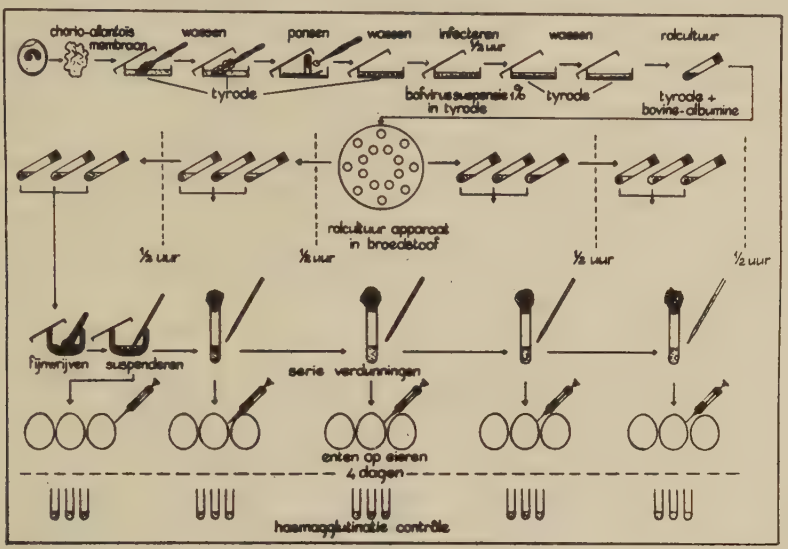
Teneinde te kunnen nagaan hoeveel virus zich na bepaalde variërende incubatieperioden in de weefselstukjes heeft gevormd, wordt op gezette tijden een aantal buisjes uit de proef genomen. Wij namen steeds de vliesjes van drie buisjes (9 stuks); deze worden tezamen in een mortier fijngewreven. Het fijngewreven weefsel wordt in 0,5 cc physiologische zoutoplossing (met penicilline en streptomycine) gesuspendeerd, waarna van hieruit een verdunningsreeks met stappen van tien wordt gemaakt. Vervolgens wordt op de in III, C, 1. beschreven wijze de infectietiter van de gepoolde weefselstukjes bepaald. Iedere bepaling geschiedde in duplo.

Teneinde te kunnen nagaan of het weefsel met een virussuspensie (allantoisvocht) van voldoende hoge virusconcentratie was besmet, werd bij iedere proef de infectietiter van het allantoisvocht bepaald. Was de infectietiter hiervan n. l. 4 of lager (in negatieve logarithme), dan trad geen of slechts een geringe virusreproductie op.

De zojuist beschreven techniek leent zich zeer goed voor ons onderzoek naar de virusremmende werking van stoffen. Deze werden daartoe in de te testen concentraties opgelost in het cultuurmedium, waarna de met virus besmette weefselstukjes werden toegevoegd (zie Hoofdstuk VI).

Met de techniek is het eveneens mogelijk, proeven te doen over de wijze, waarop de stoffen werkzaam zijn (zie Hoofdstuk VII).

Voor een schematische weergave van de beschreven proefmethodiek, zoals deze in een hiervan enigszins afwijkende vorm werd toegepast, zie figuur 4.



Figuur 4
Schema rolcultuurtechniek.
(H. L. Wolff, Acta Leidensia 26, 1957, 211)

5. Warburgtechniek

Het lag in de bedoeling, de reproductieproeven met het bofvirus ook met behulp van het Warburgapparaat uit te voeren. Met deze methode is het n. l. mogelijk om in één proefopstelling zowel de invloed van de te onderzoeken stof op de ademhaling van het weefsel als op de reproductie van het virus in het weefsel na te gaan.

In het onderzoek werden twee Warburgapparaten benut; bij het ene apparaat kon de snelheid van beweging worden geregeld (ongeveer 70 uitslagen per minuut werd aangehouden), de uitslag daarentegen was gefixeerd; bij het andere apparaat (Becker) kon óók de uitslag worden gewijzigd (70 uitslagen en een amplitude

van 25 schaaldelen, d.i. een hoek van 10^{o} links en rechts van de mediaan, werd aangehouden).

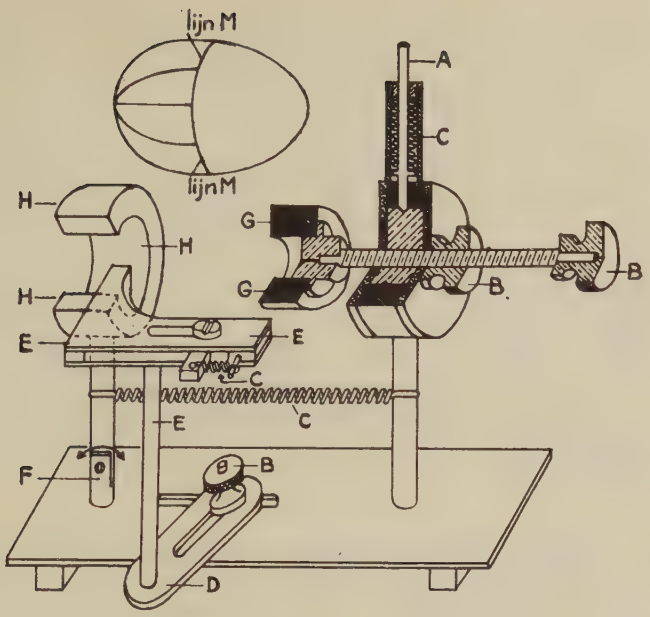
Alle manometers met bijbehorende vaatjes werden geijkt volgens de methode, welke door Zwart (162 a) werd beschreven. De ijkingsgetallen zijn bij het eerste Warburgapparaat gebaseerd op 4,2 cc vloeistof per vaatje, d.i. 4 cc cultuurmedium en 0,2 cc 10% loog (KOH) in het binnenste vaatje, voor het tweede apparaat op 3,2 cc vloeistof per vaatje.

Aanvankelijk werden de reproductieproeven met het bofvirus uitgevoerd met 12 geponste chorioallantois vliesjes per vaatje. Naar aanleiding van de resultaten van het door Burr en medewerkers (109) verrichte onderzoek (zie Hoofdstuk II, F.) werd later tot het gebruiken van méér weefsel per vaatje overgegaan. Hoewel door de onderzoekers werd geconstateerd, dat er geen verband was tussen de hoeveelheid geproduceerd virus (influenzavirus) en de hoeveelheid gebruikt weefsel – mits aan een minimaal weefselgewicht van 100 mg natgewicht per vaatje was voldaan – werd toch besloten een methode te zoeken, waarmee het mogelijk is in alle vaatjes eenzelfde hoeveelheid weefsel te brengen. Immers, althans voor de ademhalingsproeven is het van belang, dat zich in de vaatjes weefsel met zoveel mogelijk gelijke ademhalingscapaciteit bevindt.

De methode, waarmede tenslotte bevredigende resultaten werden verkregen, is als volgt:

Vanaf het centrum van de stompe pool van een 12 dagen oud kippenei (luchtkamer-zijde) wordt op een willekeurige plaats een afstand van 4,5 cm afgemeten. Op deze hoogte wordt met een potlood een lijn M rondom op de eischaal getrokken. Met behulp van een op het laboratorium ontworpen apparaatje (zie figuur 5), wordt vervolgens dat deel van de eischaal, dat grenst aan de luchtkamer, in acht ongeveer gelijke stukken verdeeld. Daartoe worden vanaf de stompe pool potloodlijnen getrokken naar acht op onderling gelijke afstand liggende punten op lijn M. Met een fijn schaartje wordt de eischaal, na van te voren met jodiumtinctuur te zijn behandeld, in sectoren geknipt en het chorioallantois weefsel, dat aan de eischaal is blijven zitten, voorzichtig afgepeld. De stukjes chorioallantois membraan worden bij de proeven steeds „at random" over de vaatjes (4, 6 of 8 vliesjes per vaatje) verdeeld.

Bezwaren tegen deze methode zijn, dat de lijn M steeds op 4,5 cm van de top wordt getekend, ongeacht de grootte van het ei. Dus zal het 1/8 deel van lijn M op het éne ei niet even groot zijn als het 1/8 deel van lijn M op het andere ei. Het spreekt vanzelf, dat deze moeilijkheid zo goed mogelijk werd ondervangen, door eieren te kiezen, die nagenoeg even groot waren. Ook is het ei geen bol en bovendien onregelmatig gevormd, zodat indien meer afstanden van 4,5 cm werden afgepast, de lijn M niet rechtlijnig, doch enigszins „golvend" zou verlopen. Het kiezen van één enkel punt voor het tekenen van lijn M is dus in feite onnauwkeurig geweest, doch tijdgebrek liet geen betere methode toe (het afpassen van meer punten en het trekken van de gemiddelde lijn).



Figuur 5

A. snapper; B. kartelschroef; C. spanveer; D. verstelflens; E. schrijfleunspaan; F. scharnier; G. verstelbare eihouder; H. eihouder

Ei-apparaatje voor het vervaardigen van stukjes chorioallantois membraan met gelijk oppervlak.

Uit het voorafgaande blijkt, dat wij getracht hebben bij het vervaardigen van de weefselstukjes, de oppervlakken hiervan zo goed mogelijk gelijk te maken, ten einde per vaatje een gelijke hoeveelheid ademend weefsel te verkrijgen. Behalve de grootte van de vliesjes zijn er evenwel nog andere factoren, die de ademhaling kunnen beinvloeden, zoals verschil in dikte van het membraan, aanwezigheid van venen en arterien; deze hadden wij minder of in het geheel niet in de hand. Als gevolg hiervan kunnen dus ook tussen de vliesjes met gelijke oppervlakken nog vrij aanzienlijke verschillen in ademhalingsintensiteit bestaan.

Door meerdere vliesjes per vaatje te nemen en de weefselstukjes „at random" over de vaatjes te verdelen werd getracht de variatie in de ademhaling zo gering mogelijk te maken.

Met de op bovenbeschreven wijze verkregen weefselstukjes werden een aantal reproductieproeven met het bofvirus ingezet. Behalve verschil in hoeveelheid ingebracht weefsel was de proefopstelling bij de Warburgproeven geheel gelijk aan die van de rolcultuurproeven. Voor iedere bepaling werd het weefsel van één vaatje gebruikt (4 of 8 vliesjes, resp. ± 100 en 200 mg aan natgewicht).

Het bleek aanvankelijk onmogelijk virusreproductie in het Warburgapparaat te doen plaats vinden. Eerst na wijziging van de

techniek (infectietiter werd van weefsel + erbijbehorende cultuurmedium bepaald) slaagden wij er tenslotte in behoorlijke infectietiters te verkrijgen; een duidelijke toename vond echter op een aanzienlijk later tijdstip plaats dan bij de rolcultuurproeven (72, resp. 17 uur).

Hoewel het dus mogelijk is gebleken, virusreproductie in het Warburgapparaat te doen optreden, leek ons de techniek ongeschikt als standaardmethode voor reproductieproeven. De proefopstelling is vergeleken met de rolcultuurproeven tamelijk ingewikkeld en tijdrovend. Bovendien is het mogelijk dat tijdens de lange proefduur door het schudden van de vaatjes beschadiging van de weefselstukjes optreedt, met als gevolg afname van de virus reproductie. Voor één enkele stof uit de reeks (Congorood) echter werd een dergelijke proef met de Warburgtechniek ingezet. Voor alle overige stoffen werd de virusremmende werking met de rolcultuurtechniek, de ademhalingsremmende werking met de Warburgtechniek onderzocht.

6. Eitechniek

Bij het onderzoek naar stoffen met een virusremmende werking werd de voorkeur gegeven aan de zojuist beschreven rolcultuur- en Warburg-techniek. Niettemin werd een aantal proeven met behulp van de eitechniek uitgevoerd.

Met deze methodiek, die aanzienlijk eenvoudiger en minder tijdrovend is, werd de virusremmende werking van de te onderzoeken stof nagegaan, door 0,1 cc van de opgeloste stof in de allantoisholte van een aantal eieren te brengen. De proefeieren, die evenals de controle-eieren (deze kregen i.p.v. stof, 0,1 cc physiologische zoutoplossing) van te voren reeds met virus waren besmet (0,1 cc allantoisvocht), werden 5 - 6 dagen bij 35°C. verder bebroed, waarna het allantoisvocht van proef- en controle-eieren aan de hand van haemagglutinatie- en/of infectietiter op virusconcentratie werd onderzocht.

Hoofdstuk IV

REMMING VAN DE BOFVIRUS REPRODUCTIE OVERZICHT STOFFEN

In de afgelopen tien jaar zijn vele stoffen ontdekt, die virusreproductie in laboratoriumproeven kunnen verhinderen; geen enkel van deze stoffen heeft echter toepassing gevonden in de bestrijding van virusziekten bij de mens.

Gezien de wijze, waarop virusreproductie plaats vindt (zie Hoofdstuk II, F.) is dit feit niet zo verwonderlijk; virussen zijn immers op zich zelf metabolisch inerte structuren, die voor hun reproductie volkomen afhankelijk zijn van de specifieke gastheercel.

Om deze reden is het begrijpelijk, dat ten aanzien van practische toepassing, zeer speciale eisen aan een stof met virusremmende werking worden gesteld; de stoffen moeten n.l. de virusreproductie wel, het metabolisme van de gastheercel daarentegen zo min mogelijk aantasten, ondanks het feit, dat beide processen zeer nauw met elkaar zijn verweven (selectieve remming, vgl. 93).

Het spreekt welhaast vanzelf, dat alle verbindingen, selectieve inhibitoren incluis, bij voldoende hoge concentratie toxisch voor het weefsel zijn. Het is dus van groot belang vast te stellen, welke concentratie van een bepaalde stof in staat is de virusreproductie te remmen, zonder dat hierbij irreversibele beschadiging van het weefsel optreedt.

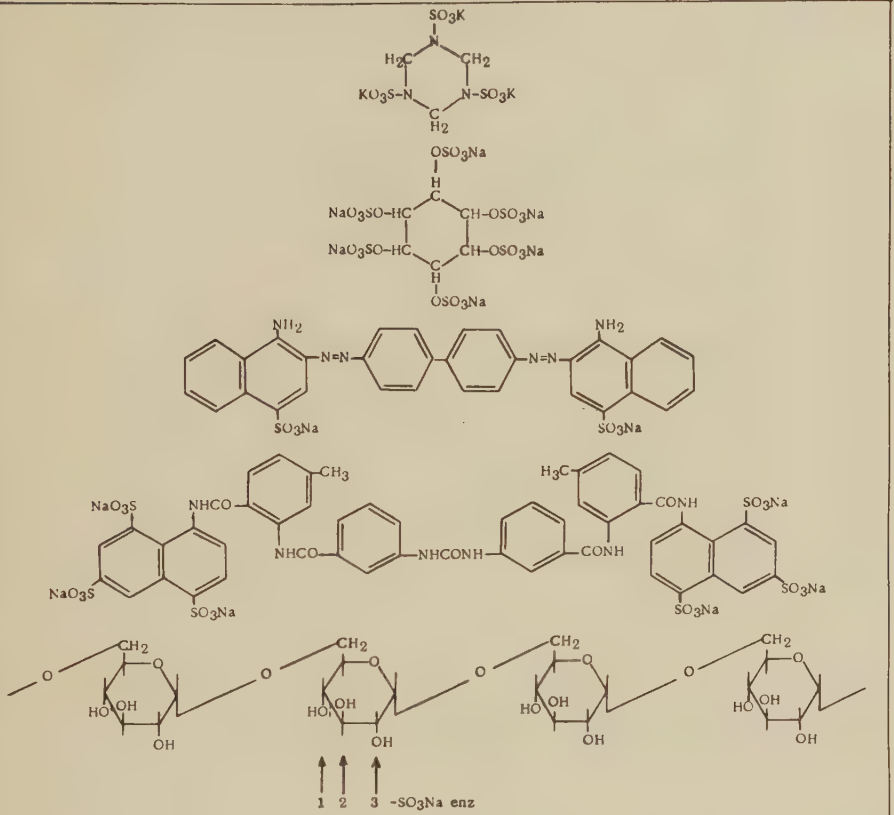
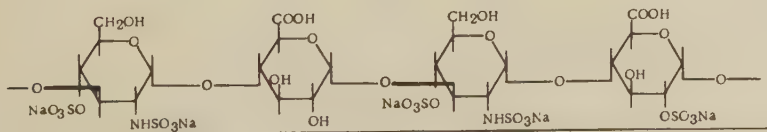
Door ons werd een onderzoek verricht naar de virusremmende werking van verschillende typen poly-anionen. De volgende overwegingen, gebaseerd op gegevens uit de literatuur, lagen aan de keuze ten grondslag.

Uit een reeks onderzoekingen (vgl. 163) is gebleken, dat het aanhechtingsmechanisme van influenza- en New Castle Diseasevirus aan erythrocyten of gastheercellen enerzijds en van bacteriophaag aan bacteriecellen anderzijds in bepaalde opzichten overeenkomsten vertonen. Voor beide systemen is adsorptie van virus aan de cel onafhankelijk van de temperatuur en van de pH over een groot gebied, daarentegen sterk afhankelijk van de concentratie van bepaalde kationen (zie ook pagina 21). Ook het feit, dat de rol van de cel in het adsorptieproces kan worden overgenomen door glasfilters en kationenuitwisselaars (89, 163) waarbij de specifieke zout-vereisten blijven gelden, duidt er op, dat de hechting van virus aan cel tot stand komt door electrostatische interactie tussen bepaalde „plekken" op het oppervlak van beide deeltjes.

Tabel I

Nummer	Stof	Moleculair-gewicht	% H_2O	Opmerkingen
I	hexahydro-1,3,5-triazine-1,3,5-trisulfonzuur-kalium	441		
II	inositolhexasulfaat-natrium	990	20	
III	Congorood (Na-zout)	696		
IV	Suramine (Na-zout)	1429		
V	dextraansulfaat 9/2,6	9.000	7,6	2,6 SO_3Na/glucose
VI	dextraansulfaat 14/1,8	14.000	11,9	1,8 SO_3Na/glucose
VII	dextraansulfaat 14/1,4	14.000	10,6	1,4 SO_3Na/glucose
VIII	dextraansulfaat 14/0,8	14.000	13,8	0,8 SO_3Na/glucose
IX	dextraansulfaat 20/2,7	20.000	6,3	2,7 SO_3Na/glucose
X	dextraansulfaat 20/1,9	20.000	7,2	1,9 SO_3Na/glucose
XI	dextraansulfaat 20/1,1	20.000	7,5	1,1 SO_3Na/glucose
XII	dextraansulfaat 22/0,3	22.000	9,7	0,3 SO_3Na/glucose
XIII	dextraansulfaat 30/2,1	30.000	14,3	2,1 SO_3Na/glucose
XIV	Heparine (Na-zout)	~ 16.000		5 sulfaatgroepen per tetra-saccharide

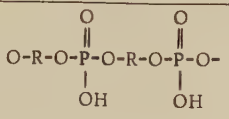
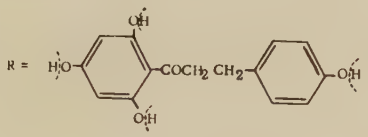
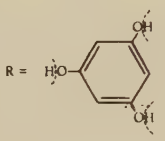
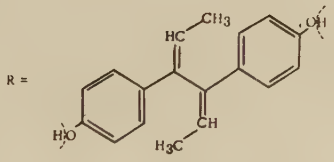
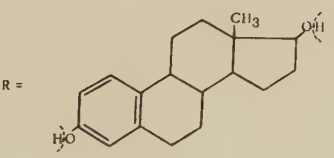
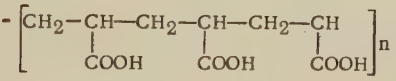
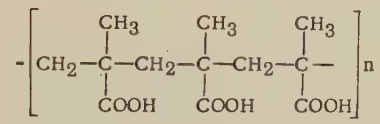
Tabel I

Structuur

1 2 3 -SO_3Na enz
idem
idem
idem
idem
idem
idem
idem
idem


Tabel I (vervolg)

Nummer	Stof	Moleculair-gewicht	% H_2O	Opmerkingen
XV t/m XX				
XV	polyphloretine-phosphaat Fl 1056 A	~ 15.000	2,9	
XVI	polyphloretine-phosphaat Fl 1056 B	~ 15.000	2,5	
XVII	polyphloretine-phosphaat Fl 1059	~ 15.000	4,2	
XVIII	polyphloroglucinol-phosphaat	~ 15.000		
XIX	polyester van 4,4'-dihydroxy-γ,δ-diphenyl-β,δ-hexadiene Dbf 43 bd	~ 15.000	1,9	
XX	polyoestradiol-phosphaat	~ 15.000	3,3	
XXI	polyacrylzuur	?	20	
XXII	polymethacrylzuur V	25.800	20	
XXIII	polymethacrylzuur V, 2/c	129.000	20	

Tabel I (vervolg)

Structuur


idem
idem






Tabel I (vervolg)

Ad. I, II: Research Laboratorium, Nedchem (Chininefabrieken), Amsterdam.
Ad. III : Handelsproduct.
Ad. IV : Handelsproduct, Bayer (Nedigepha, Amsterdam).
Ad. V t/m XIII: Poviet Producten, Amsterdam.

De in tabel I voor deze stoffen opgenomen waarden voor het aantal SO_3Na-groepen per glucose-ring, moeten als gemiddelden worden geïnterpreteerd. Als zodanig beschouwd bezitten de dextraansulfaten 14/1,4 (VII), 14/0,8 (VIII) en 20/1,1 (XI) gemiddeld 1 SO_3Na-groep per glucose eenheid, de dextraansulfaten 14/1,8 (VI), 20/1,9 (X) en 30/2,1 (XIII) gemiddeld 2 SO_3Na-groepen per glucose eenheid, terwijl bij de dextraansulfaten 9/2,6 (V) en 20/2,7 (IX) alle drie beschikbare plaatsen (OH-groepen) met zwavelzuur zijn veresterd.

Ad. XIV: Handelsproduct, Organon N.V., Oss.
Ad. XV t/m XX: Aktiebolaget Leo, Hälsingborg, Zweden.
Ad. XXI t/m XXIII: Weizmann Institute of Science, Rehovote. Israël.

Het onderzoek werd mogelijk gemaakt, dank zij de grote bereidwilligheid waarmede Research Laboratoria en Farmaceutische Industrieën bepaalde praeparaten op ons verzoek beschikbaar stelden.

Voor deze essentiële medewerking ben ik aan
Drs. P.J. van Sprang, Apotheker, Nedigepha, Amsterdam,
Drs. G.G.A. Mastenbroek, Poviet Producten, Amsterdam,
Dr. J.V.R. Everse, Organon N.V., Oss,
Dr. O. Fernö, Aktiebolaget Leo, Hälsingborg en
Dr. H. Eisenberg, Weizmann Institute of Science, Rehovote,
bijzondere dank verschuldigd.

De oppervlakken van virus en cel blijken te zijn opgebouwd uit macromoleculaire structuren, waarin geladen groepen voorkomen (164). In zeer verdunde bufferoplossingen en bij physiologische pH dragen virus en cel een negatieve lading (164, 165, 165 a). Als gevolg hiervan zal in een zoutvrij milieu adsorptie van virus achterwege blijven, aangezien door wederzijdse afstoting nadering onmogelijk wordt. Toevoeging van kationen leidt tot een zodanige verandering in electrostatische configuratie van de bindings-„plekken", dat de op het virusoppervlak gelegen „plekken" complementair worden aan die van het celoppervlak (165, 165 a). In overeenstemming met het voorgaande is het feit, dat aan erythrocyten of glasfilters (negatief geladen electrolyten) geadsorbeerde virusdeeltjes hiervan zijn los te maken (reversibele binding) door behandeling met gedestilleerd water of cultuurmedium zonder zouten (89, 165). Uit onderzoekingen van Puck en medewerkers (166, 167) is tenslotte gebleken, dat geioniseerde carboxylgroepen van de bacteriewand en geioniseerde aminogroepen van het bacteriophaag-oppervlak betrokken zijn in de binding.

De mogelijkheid om met kationenuitwisselaars of glasfilters (naar alle waarschijnlijkheid slechts een zwakke afspiegeling gevend van het ladingspatroon van de celwand) reacties na te bootsen, welke normaal aan het celoppervlak plaats vinden, voerden ons tot de vraag of verschillende typen poly-anionen eveneens in staat zouden zijn met het cel-oppervlak te concurreren, in casu ten opzichte van het bofvirus.

In ons onderzoek werden poly-anionen behorende tot de groep van polysulfonzuren, polyzwavelzure esters, polyphosphorzure esters en polycarbonzuren betrokken (tabel I).

Zoals uit tabel I blijkt, varieren de stoffen per reeks onderling in ladingsdichtheid (dextraansulfaten) en moleculairgewicht;

de reeksen onderscheiden zich van elkaar door verschil in structuur der negatieve groepen.

Door de ladingsdichtheid te veranderen, kan mogelijk enig inzicht worden verkregen in het verband tussen werkzaamheid en ladingspatroon.

Een aantal stoffen uit de reeksen is reeds in andere gevallen op virusremmende werking onderzocht. Zo werd voor Congorood (III) een remmend effect op de influenzavirus reproductie in bebroede kippeneieren aangetoond (168); het effect was volgens de onderzoekers niet het gevolg van een viricide werking van de stof.

Ook op de reproductie van bepaalde encephalitis virussen (Eastern equine encephalitis- en louping ill-virus) werkt Congorood in beperkte mate reducerend (169).

Suramine (IV) – een trypanocide stof – bleek zonder effect op de reproductie van kanarie pokkenvirus in eieren (170); ook tegen de bovengenoemde encephalitis virussen bleek de stof niet werkzaam (169).

Van de dextraansulfaten (V t/m XIII) en polycarbonzuren (XXI t/m XXIII) zijn geen gegevens over virusremmende werking bekend.

Van de door ons onderzochte polyphosphorzure esters (XV t/m XX) zijn er enkele (162, 171) in staat de reproductie van influenzavirus in bebroede kippeneieren te beinvloeden; één der stoffen (XVIII) heeft eveneens het vermogen het virus in vitro te inactiveren (viricide werking van de stof).

Wellicht is van belang te weten, dat Congorood, Suramine en de dextraansulfaten in staat zijn de bloedstolling te vertragen. Vooral de dextraansulfaat reeks is in dit opzicht nauwkeurig onderzocht (172). Congorood, Suramine en Heparine werken bovendien remmend t.o.v. hyaluronidase (vgl. 173; 174); de door ons onderzochte polyphosphorzure esters vertonen dit effect eveneens in sterke mate (vgl. 173).

Hoofdstuk V

INVLOED VAN DE OP VIRUSREMMING ONDERZOCHTE STOFFEN OP DE ADEMHALING VAN HET CHORIOALLANTOIS MEMBRAAN

Hoewel uit de literatuur bekend is (109, 133, 175), dat virusreproductie ook onder voor het weefsel ongunstige omstandigheden kan plaats vinden, leek het ons van belang na te gaan in hoeverre de reproductieremmende werking van de diverse stoffen eventueel (mede) veroorzaakt wordt door een toxisch effect op het chorioallantois membraan. Daartoe werden met het merendeel der onderzochte stoffen ademhalingsproeven met het Warburgapparaat uitgevoerd. Kon onder invloed van de stof remming van de ademhaling worden geconstateerd, dan werd dit door ons als indicatie voor weefseltoxiciteit beschouwd.

Op de in Hoofdstuk III, C, 5. beschreven wijze werden membraansectoren gemaakt; de van de verschillende eieren afkomstige weefselstukjes werden gepoold en vervolgens naar willekeur over de vaatjes (4, 6 of 8 membraanstukjes per vaatje) verdeeld.

De vaatjes werden gevuld met 3 of 4 cc cultuurmedium (afhankelijk van het gebruikte Warburgapparaat), waaraan penicilline en streptomycine in de in Hoofdstuk III, B. aangegeven concentraties waren toegevoegd. In het cultuurmedium van de proefvaatjes was bovendien nog de stof in de te onderzoeken concentratie opgelost. Over het algemeen werden de experimenten zodanig uitgevoerd, dat per proef- en controle-groep drie vaatjes werden benut; een enkele maal was dit aantal twee of vier. Bij gebruik van twee of drie vaatjes per groep is het gezien de beschikbare hoeveelheid vaatjes mogelijk, de ademhaling van twee verschillende proefgroepen te vergelijken met die van één controle-groep.

De stoffen werden voor zover hun oplosbaarheid en de beschikbare hoeveelheid dit toelieten, over het algemeen in de hoogste, bij de remmingsproeven gebruikte concentraties onderzocht.

De periode, waarin de invloed op de ademhaling werd gevolgd, komt ongeveer overeen met de tijd, die met de rolcultuurproeven nodig is gebleken om een behoorlijke virusproductie in de weefselstukjes te verkrijgen (ongeveer 23 uur). Voor één proef werd de ademhaling in deze tijdsduur onafgebroken bepaald, in alle overige proeven werd de zuurstofopname van 0 - 8 uur en 19 - 25 uur gevolgd. In de hiertussen liggende, nachtelijke uren waren de manometerkranen geopend.

Het is gezien de lange duur van de proeven van belang, dat weefselbeschadiging als gevolg van een te hoge schudfrequentie zoveel mogelijk wordt vermeden. Daarom is deze bij de Warburg-

proeven zo laag mogelijk gehouden; het spreekt vanzelf, dat voor een goede gasuitwisseling, speciaal bij gebruik van veel weefsel, de frequentie aan een bepaald minimum is gebonden. Door ons werden de op pagina 35 vermelde waarden aangehouden.

Uit de manometer-aflezingen werd de per half uur opgenomen hoeveelheid zuurstof volgens de methode van Umbreit (176) berekend.

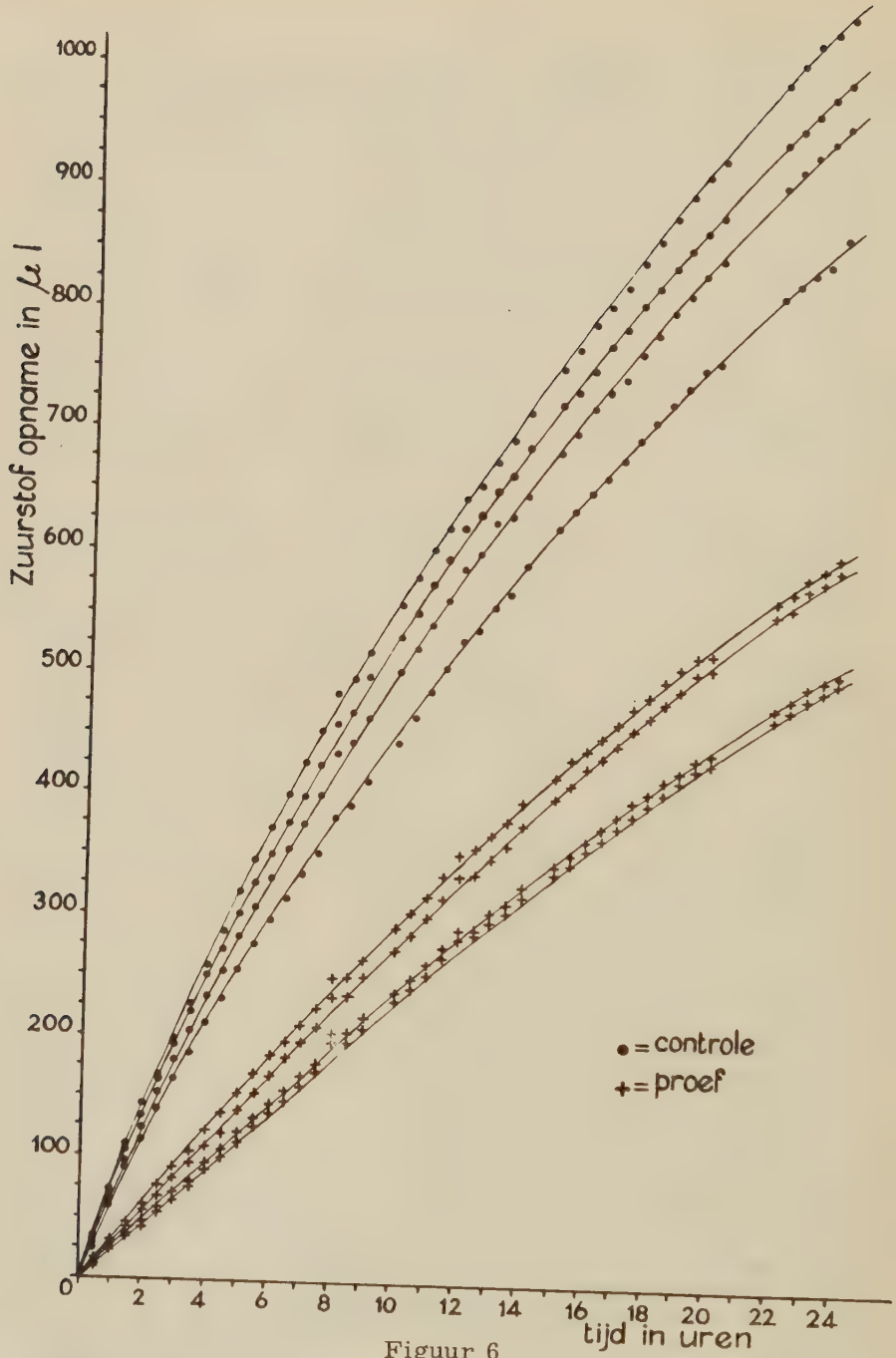
Voor alle proeven werden ademhalingscurven getekend; in figuur 6 is een dergelijke curve, die het ademhalingsverloop over een periode van 24 uur zonder onderbreking weergeeft, afgebeeld.

Om de diverse ademhalingscurven te kunnen vergelijken, werd getracht een formule voor een kromme met twee of drie parameters op te stellen, die door juiste keuze van deze parameters alle ademhalingscurven zou kunnen weergeven. Als dit gelukt zou zijn, dan zou ook voor de niet waargenomen tijd (de periode van 8 - 19 uur) door interpolatie de ademhaling berekend kunnen worden.

Het is echter niet gelukt een dergelijke formule te vinden (onderzocht aan de door figuur 6 weergegeven ademhalingscurven). Rechtstreeks vergelijken van de overige krommen, waarbij des nachts niet werd waargenomen, is over het gehele traject van 0 - 24 uur dus niet mogelijk. Echter zelfs voor de waarnemingen, die binnen één dag zijn verricht is rechtstreeks vergelijken van de curven niet redelijk, aangezien zij door de verschillende hoeveelheid ingebracht levend weefsel per vaatje (resp. door verschillende activiteit van het weefsel) reeds verschillen. Teneinde toch te kunnen controleren in hoeverre het verloop van de ademhaling in de tijd bij de diverse proeven overeenstemde en tevens een maat te verkrijgen voor de ademhalingremmende werking van de diverse stoffen, werd besloten in drie verschillende, niet aaneensluitende perioden van één uur de hoeveelheid opgenomen zuurstof in de proef- en controle-vaatjes te bepalen. Daartoe werden door de experimentele punten, die dus in het algemeen niet op een rechte lijn liggen, op het oog zo goed mogelijk vloeiende lijnen getrokken, waarna vervolgens uit deze lijnen het zuurstofverbruik over de periode van 60-120 minuten en over die van 360-420 minuten (resp. 240-300 minuten) gedurende de eerste dag en over de periode van 60-120 minuten gedurende de tweede dag werd bepaald. De eerstgenoemde perioden vertegenwoordigen het begin en het einde van de curve van de eerste dag (de tijd van 0 tot 60 minuten werd niet gekozen, aangezien een aantal malen in deze periode een ten opzichte van de overige waarnemingen afwijkend en wel hoger zuurstofverbruik werd geconstateerd), de laatstgenoemde periode vertegenwoordigt het begin van de curve van de tweede dag. Gedurende deze tweede proefdag was het ademhalingsverloop in de meeste gevallen vrijwel rechtlijnig.

De voor de proef- resp. controle-vaatjes per periode verkregen waarden werden gemiddeld; deze gemiddelden zijn in tabel II vermeld.

Indien het verschil tussen de controle-curven onderling uitsluitend wordt veroorzaakt door een verschil in de hoeveelheid,



Figuur 6
Invloed van polyphloroglucinol-phosphaat (0,3 mol./1 x 10^{-3}) op de ademhaling van chorioallantois membraan

Tabel II
Gemiddelde ademhaling van 6 membraan-sectoren, uitgedrukt in µl/uur

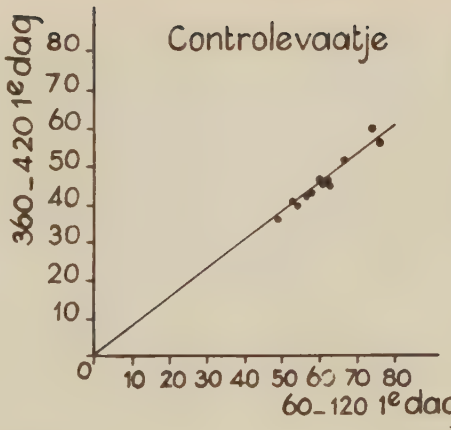
Nummer stof	Concentratie mol./l x 10^3	60 - 120 min. 1e dag		360 - 420 min. 1e dag		60 - 120 min. 2e dag		Aantal vaatjes
		Proef	Controle	Proef	Controle	Proef	Controle	
I	45,0	34,5 **	54,0	29,0 **	40,0	4,0 **	35,0	4
II	80,8	26,3 **	76,0	10,0 **	56,0	0,0	38,3	3
IV	3,5	42,3 **	74,3	38,0 **	60,3	30,3 **	41,3	3
IV	3,5	47,7 **	60,7	43,0	46,0	25,0 **	30,3	3
IV	3,5	37,7 **	76,0	32,7 **	56,0	20,0 **	38,3	3
IV	1,8	49,7 **	60,7	43,3	46,0	26,7	30,3	3
V	18,5	29,7 **	57,8	13,3 **	43,0	0,0	x	4/3
VI	0,9	52,0 **	67,3	39,3 **	51,3	32,7	35,0	3
VII	4,5	38,0 **	57,3	33,5 *	42,7	26,0 *	34,7	3/2
VIII	0,6	59,5	67,3	47,0	51,3	40,0	35,0	3
IX	5,6	29,0 **	74,3	14,7 **	60,3	2,7 **	41,3	3
X	4,6	33,3 **	63,0	23,3 **	45,0	10,0 **	30,3	3
XI	4,6	33,5 **	57,3	25,0 **	42,7	21,0 **	34,7	3/2
XIV	0,6	36,7 **	63,0	30,6 **	45,0	26,7	30,3	3
XV	0,3	52,2	60,0	36,2 **	46,8	17,2 **	34,2	4
XVII	1,0	17,2 **	57,8	4,0 **	43,0	0,0	x	4
XVII	0,3	52,5	53,0	43.0	41,0	26,0 *	30,5	4
XVIII	0,3	35,2 **	48,8	34,5	36,8	21,2	23,2	4
XVIII	0,3	26,0 **	62,0	25,5 **	46,0	18,2 **	29,0	4
XIX	0,3	51,7 **	62,3	x	x	12,5 **	30,0	3

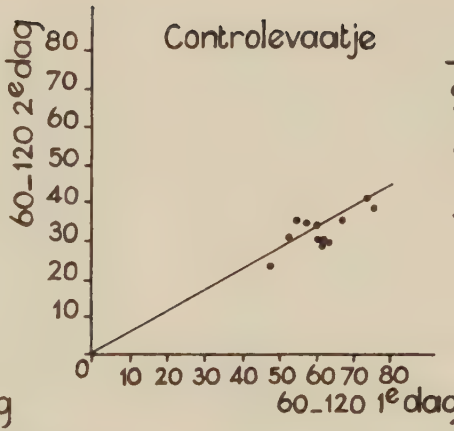
* = Gemiddelde ademhaling van de proefvaatjes is significant lager dan die van de controle-vaatjes op het 5% punt.
** = Gemiddelde ademhaling van de proefvaatjes is significant lager dan die van de controle-vaatjes op het 1% punt.
x = Ademhaling is niet bepaald.
4/3 = 4 controle-vaatjes en 3 proefvaatjes.
3/2 = 3 controle-vaatjes en 2 proefvaatjes.
Gemiddelde standaardafwijking per periode resp. 7,0 µl, 5.4 µl en 3,8 µl.

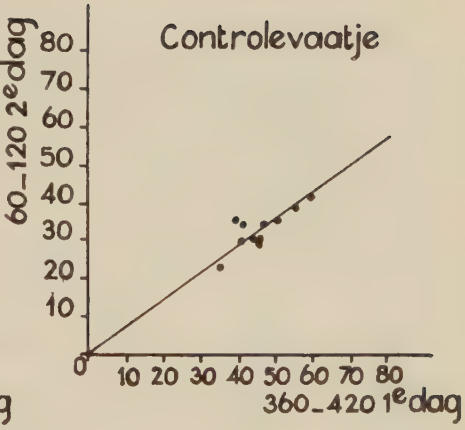
resp. activiteit van het levende weefsel, dan zal de ademhaling Y als functie van de tijd voorgesteld kunnen worden door de formule $Y = \alpha f(t)$, waarbij t de tijd is sedert het begin van de proef verlopen, α een evenredigheidsfactor die uitsluitend afhangt van de hoeveelheid, resp. activiteit van het weefsel, terwijl f(t) voor alle proeven dezelfde is. Indien nu voor elke proef de ademhaling in de eerste periode wordt uitgezet tegen de ademhaling in de tweede periode (resp. eerste periode tegen derde of tweede periode tegen derde), dan zullen de desbetreffende punten, als het bovenstaande mathematische model juist is, op een rechte lijn door de oorsprong liggen (zie figuur 7a).

Uit de figuur voor de controle-vaatjes blijkt, dat de punten inderdaad behoorlijk op een rechte lijn door de oorsprong georienteerd liggen. Het lijkt zeer waarschijnlijk, dat wij er in geslaagd zijn een reproduceerbaar verloop van de ademhalingen te verkrijgen [f(t) is voor al onze controle-proeven éénzelfde functie], doch dat het niet gelukt is de hoeveelheid, resp. activiteit van het weefsel waarmee de proeven werden begonnen, gelijk te krijgen.

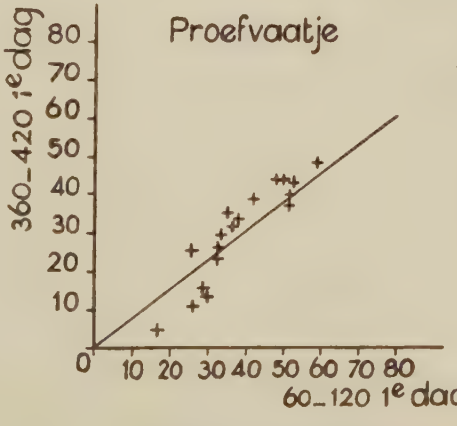
a

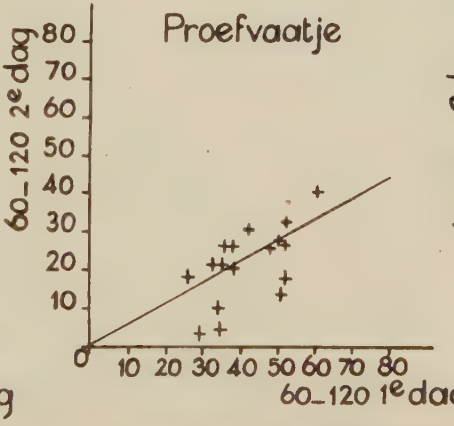


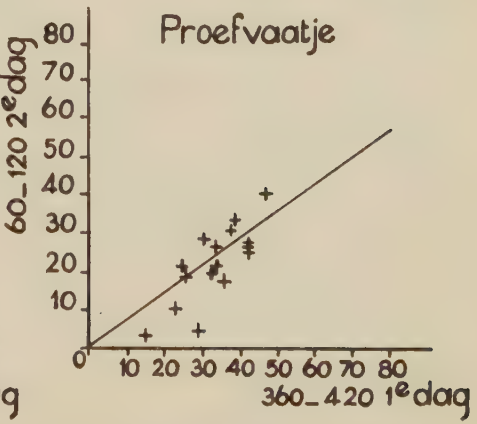




b







Verband tussen ademhaling in eerste en tweede periode

Verband tussen ademhaling in eerste en derde periode

Verband tussen ademhaling in tweede en derde periode

Figuur 7

Eenzelfde grafiek als voor de controle-vaatjes werd ook voor de proefvaatjes gemaakt (zie figuur 7b); de lijnen, die door de oorsprong zijn getrokken zijn die, welke voor de controle-vaatjes werden gevonden. Uit de grafiek blijkt, dat voor een aantal proeven de desbetreffende punten redelijk om de lijnen georienteerd liggen, zij het dan ook, dat in het algemeen de punten wat dichter bij de oorsprong liggen. Voor dergelijke proeven kan uit de grafiek de hypothese worden afgeleid, dat de toegepaste stof in het algemeen een constante ademhalingsremming geeft. Immers naarmate α kleiner is, ligt het punt dichter bij de oorsprong. Voor een aantal andere stoffen echter liggen de punten klaarblijkelijk beneden de lijnen. Bij dergelijke proeven wordt het verband tussen ademhaling en tijd niet meer door dezelfde functie als voor de controle-vaatjes geldt weergegeven; hier vindt, naar wij aannemen als gevolg van afsterving van cellen, klaarblijkelijk met de tijd toenemende remming plaats.

Het is niet ondenkbaar, dat de verschillen in ademhaling tussen de vaatjes van één groep (mede) veroorzaakt worden door verschil in gewichtshoeveelheid ingebracht weefsel. Teneinde te kunnen nagaan van welke orde van grootte eén dergelijk effect kan zijn, werd van een groot aantal membraansectoren het drooggewicht (d.i. luchtdroog) bepaald en wel zodanig, dat de acht van één ei afkomstige vliesjes steeds gescheiden van die van de overige eieren werden gewogen. De vliesjes werden op kleine geponste stukjes zijdepapier van bekend gewicht gebracht en gedurende twee dagen bij 37°C. gedroogd. Vervolgens werden de papiertjes met de daaraan gehechte vliesjes gewogen (torsie balans), waarna het drooggewicht van de vliesjes kon worden berekend (zie tabel III).

Tabel III
Drooggewichten van membraansectoren

Ei nr. 1	Ei nr. 2	Ei nr. 3	Ei nr. 4	Ei nr. 5
4,10 mg	3,25 mg	10,40 mg *)	2,72 mg	2,56 mg
3,66 mg	4,10 mg	2,01 mg	3,69 mg	2,88 mg
3,10 mg	3,55 mg	4,05 mg	3,20 mg	4,65 mg
3,00 mg	4,15 mg	4,48 mg	4,05 mg	3,10 mg
4,00 mg	2,28 mg	2,95 mg	3,70 mg	5,25 mg
4,10 mg	3,28 mg	2,79 mg	2,62 mg	5,30 mg
3,45 mg	7,80 mg *)	3,05 mg	3,15 mg	3,29 mg
3,48 mg	2,90 mg	2,40 mg	8,25 mg *)	6,40 mg

*) = vliesje met hoge waarde voor drooggewicht, waarschijnlijk als gevolg van aangehecht eiwit materiaal.

Bij het vervaardigen van de membraansectoren werd opgemerkt, dat in een aantal gevallen aan de weefselstukjes een hoeveelheid gelatine-achtige substantie bevond. Dit materiaal, dat zeker geen zuurstof opneemt, beinvloedt sterk het gewicht der vliesjes. Waarschijnlijk zijn de hoge waarden, welke in tabel III met een * zijn aangeduid, op grond hiervan te verklaren.

De verschillen tussen de gemiddelde vliesjes-gewichten van de

diverse eieren blijken ook na weglaten van deze drie hoge waarden (waardoor de restvariance kleiner wordt en dus eerder significantie gevonden wordt) niet significant te zijn. De standaardafwijking van de gewichten van de sectoren bedraagt 0,90 mg. Het gemiddelde gewicht 3,53 mg; de standaardafwijking bedraagt dus 25,5% van het gemiddelde gewicht (de variatie coefficient bedraagt 25,5%).

De variatie coefficienten van het zuurstofverbruik van de controle-vaatjes voor de drie perioden bedragen resp. 12,8%, 14,6% en 14,6%. Bij gebruik van 6 vliesjes per vaatje is de variatie coefficient voor de gewichten $25,5/\sqrt{6}\% = 10,4\%$. De variatie coefficienten van de ademhaling in elk der drie perioden zijn van dezelfde orde van grootte als de variatie coefficient van het gewicht van 6 vliesjes. Dit zou verklaard kunnen worden door aan te nemen, dat het verschil in zuurstofverbruik van de controle-vaatjes tussen de proeven voor een belangrijk deel het gevolg is van verschil in gewicht van het ingebrachte weefsel. Dit houdt echter in, dat de ademhaling per proef, uitgedrukt in procenten van de gemiddelde ademhaling van alle proeven voor de drie perioden ongeveer gelijk moet zijn (zie tabel IV).

Tabel IV
Ademhaling per proef, uitgedrukt in procenten van de gemiddelde ademhaling van alle proeven

Controle-vaatjes		
1e dag		2e dag
60 - 120 min.	360 - 420 min.	60 - 120 min.
97,9	101,2	104,8
86,5	88,7	93,4
88,1	86,5	107,2
102,8	97,3	92,8
109,8	111,0	107,2
93,5	92,4	106,3
121,3	130,4	126,5
99,1	99,5	92,8
124,0	121,1	117,3
79,6	79,6	71,1
101,2	99,5	88,8
94,3	93,0	-
101,7	-	91,9

De vermelde waarden werden berekend uit de gemiddelde ademhaling van controle-weefsel, welke in tabel II zijn samengevat.

Uit tabel IV blijkt, dat althans voor de eerste twee perioden de uitkomsten behoorlijk met elkaar overeenstemmen; voor de derde periode is dit verband niet zo duidelijk. Aangezien de ademhaling in deze periode gemeten werd 19 uur na aanvang van de proef, is het niet ondenkbaar, dat andere factoren dan het gewicht een rol gaan spelen (zo kunnen bepaalde cellen t.o.v. andere een langere overlevingsduur hebben).

Uit de in tabel II opgenomen gemiddelde ademhalingen van

proef- en controle-weefsel voor de drie onderscheiden perioden blijkt, dat nagenoeg alle stoffen in staat zijn de ademhaling te reduceren. Teneinde de significantie van de verschillen in ademhalingsintensiteit vast te kunnen stellen, moet de standaardafwijking van het zuurstofverbruik per experiment worden bepaald. Deze werd voor de drie perioden van proef- en controle-weefsel uit de spreidingsbreedte berekend (zie tabel V).

Tabel V
Standaardafwijking (berekend uit de spreidingsbreedte) van de ademhaling van 6 sectoren in µl/uur

Nummer stof	Concentratie mol./l x 10^3	60-120 min. 1e dag		360 - 420 min. 1e dag		60 - 120 min. 2e dag	
		Proef	Controle	Proef	Controle	Proef	Controle
I	45,0	10,7	3,2	8,3	3,9	1,0	3,4
II	80,8	5,3	3,0	1,8	3,5	-	3,0
IV	3,5	12,4	3,0	7,1	5,3	5,3	3,5
IV	3,5	12,4	3,5	8,3	6,0	6,0	4,1
IV	3,5	7,1	3,0	6,0	3,5	8,3	3,0
IV	1,8	4,1	3,5	1,8	6,0	0,6	4,1
V	18,5	7,1	5,8	7,1	1,0	-	X
VI	0,9	7,1	13,0	6,0	12,4	4,7	10,0
VII	4,5	3,5	7,1	6,1	7,1	1,8	4,1
VIII	0,6	15,0	13,0	10,6	12,4	3,5	10,0
IX	5,6	7,1	3,0	2,4	5,3	0,6	3,5
X	4,6	3,0	7,7	2,4	5,3	1,8	4,1
XI	4,6	13,3	7,1	1,8	7,1	3,5	4,1
XIV	0,6	3,0	7,7	4,7	5,3	2,4	4,1
XV	0,3	9,2	1,9	4,9	3,4	5,8	1,5
XVII	1,0	1,5	5,8	1,0	1,0	-	X
XVII	0,3	9,2	5,8	7,8	2,9	3,4	2,4
XVIII	0,3	2,9	5,3	2,9	1,5	6,3	3,4
XVIII	0,3	2,9	7,8	2,4	8,3	2,4	2,4
XIX	0,3	2,4	5,3	X	X	3,3	3,5

X = ademhaling niet bepaald; gemiddelde standaardafwijking per periode resp. 7,0 µl, 5,4 µl en 3,8 µl.

Uit deze tabel blijkt, dat de standaardafwijkingen van de controle-vaatjes niet systematisch verschillen van die van de proefvaatjes. Wel moet er gezien de uitkomsten rekening mee worden gehouden, dat de standaardafwijking van de eerste periode hoger is dan die van de tweede en deze weer hoger dan die van de derde.

Uit de tabellen II, V, VI en VII blijkt voorts, dat bij de verschillende proeven geen verband bestaat tussen gemiddelde ademhaling en de er bij behorende standaardafwijkingen. Op grond hiervan werd bij de hieronder volgende beschouwingen de absolute standaardafwijking als relevante maat voor de spreiding van de waarnemingen benut. Het lijkt dus redelijk uit de standaardafwijkingen per periode één gemiddelde standaardafwijking, geldig voor zowel proef- als controle-vaatjes, te berekenen. Deze bedraagt voor de eerste periode 7,0 µl, voor de tweede 5,4 µl en voor de derde 3,8 µl. Deze waarden werden uit de proeven van tabel II berekend. Voor de proeven uit tabel VI werden op geheel

overeenkomstige wijze eveneens de gemiddelde standaardafwijkingen berekend; deze bedragen resp. 6,1 µl, 5,1 µl en 3,7 µl en zijn in goede overeenstemming met die van de eerstgenoemde proeven (zie tabel VII).

Tabel VI
Gemiddelde ademhaling van 4 en 8 membraansectoren, uitgedrukt in µl/uur

Nummer stof	Concentratie mol./l x 10^3	60 - 120 min. 1e dag		240 - 300 min. 1e dag		60 - 120 min. 2e dag		Aantal vaatjes
		Proef	Controle	Proef	Controle	Proef	Controle	
III	2,0 [1]	40,0	35,2	39,4	35,2	26,7	25,0	4
IV	7,0 [2]	65,0 **	91,5	50,0 **	67,5	30,7	29,0	2
IV	7,0 [2]	60,0 **	97,0	56,7 **	78,3	29,3	30,3	3
IV	7,0 [1]	46,7 **	71,7	36,3 **	63,0	18,5 **	34,3	3
IV	3,5 [1]	44,8 **	71,0	38,2 **	57,8	14,8 **	35,0	4
	bofvirus [1]	81,0	71,7	68,0	63,0	40,0	34,3	2

1) = 4 membraansectoren per vaatje;
2) = 8 membraansectoren per vaatje; gemiddelde standaardafwijking per periode resp. 6,1 µl, 5,1 µl, en 3,7 µl. Voor ** zie tabel II.

Tabel VII
Standaardafwijking (berekend uit de spreidingsbreedte) van de ademhaling van 4 en 8 sectoren in µl/uur

Nummer stof	Concentratie mol./l x 10^3	60 - 120 min. 1e dag		240 - 300 min. 1e dag		60 - 120 min. 2e dag	
		Proef	Controle	Proef	Controle	Proef	Controle
III	2,0 [1]	9,2	5,8	9,7	5,8	5,3	2,9
IV	7,0 [2]	5,3	10,0	7,1	4,4	2,7	10,0
IV	7,0 [2]	5,3	5,3	3,0	3,5	3,5	0,6
IV	7,0 [1]	1,2	1,8	3,0	2,4	1,8	3,0
IV	3,5 [1]	9,2	13,6	6,3	5,8	5,0	6,3
	bofvirus [1]	0,0	1,8	5,3	2,4	0,0	3,0

1) = 4 membraansectoren per vaatje;
2) = 8 membraansectoren per vaatje; gemiddelde standaardafwijking per periode resp. 6,1 µl, 5,1 µl en 3,7 µl.

Op grond van de diverse standaardafwijkingen werd vervolgens de significantie van de verschillen in ademhaling tussen proef- en controle-weefsel eenzijdig getoetst. De uitkomsten werden in de tabellen voor de betrokken stoffen d.m.v. één of twee sterretjes vermeld: * geeft aan dat de gemiddelde ademhaling van de proefvaatjes significant lager is dan de ademhaling van de controle-vaatjes op het 5% punt, ** geeft aan dat de gemiddelde ademhaling van de proefvaatjes significant lager is dan die van de controle-vaatjes op het 1% punt (de toevalsoverschrijdingskans P is resp. kleiner of gelijk aan 0,05 en 0,01).

Uit de tabellen II en VI volgt, dat de gevonden verschillen in ademhaling voor het merendeel der onderzochte stoffen signifi-

cant zijn en dat de remming vanaf de aanvang van de proef optreedt. Voor Suramine, Heparine en polyphloroglucinol-phosphaat werd het opmerkelijke verschijnsel geconstateerd, dat de remming in de laatste periode soms niet meer merkbaar is. Vooral bij gebruik van veel weefsel per vaatje (8 vliesjes) is voor Suramine het teruggaan van de ademhalingsremming duidelijk (tabel VI). Een bevredigende verklaring voor dit verschijnsel konden wij niet vinden.

De enige stoffen welke in de geteste-lage-concentraties geen invloed op de ademhaling uitoefenden, zijn Congorood (III) en dextraansulfaat 14/0,8 (VIII).

In overeenstemming met gegevens uit de literatuur (177) werd ook voor het bofvirus geen invloed op de ademhaling tengevolge van de virusontwikkeling geconstateerd.

Hoewel de stoffen bijna zonder uitzondering de ademhaling remmen, blijkt dit effect niet gecorreleerd te zijn met hun virusremmende werkzaamheid. Door ons werd n.l. geconstateerd, dat bij sommige stoffen, wanneer zij in sterk ademhalingsremmende concentraties werden gebruikt, toch virusreproductie plaats vindt. De virusremmende werking die in de hierna te beschrijven proeven voor de diverse stoffen werd gevonden, schrijven wij generaliserend toe aan een directe werking van deze stoffen op de virusreproductie en niet aan een werking, die via ademhalingsremming verloopt.

De statistische bewerking van de uitkomsten van de in Hoofdstuk V, VI en VII beschreven proeven werd verricht door Dr. E.F. Drion van de Afdeling Bewerking Waarnemingsuitkomsten van de Centrale organisatie T.N.O.

Hoofdstuk VI

REMMING VAN DE BOFVIRUS REPRODUCTIE EXPERIMENTEN

De in tabel I opgenomen stoffen (zie pag. 40) werden met uitzondering van Congorood (III) met de rolcultuurtechniek op virusremmende werkzaamheid onderzocht. De werking van Congorood werd met de ei- en Warburg-techniek bepaald (zie pag. 57).

De stoffen werden op de in Hoofdstuk III, B. beschreven wijze aan het cultuurmedium toegevoegd. Eén der stoffen (XII) bleek niet in de Tyrode vloeistof oplosbaar; de overige, meer of minder sterk zuur reagerende stoffen losten wel gemakkelijk op. De oplossingen werden door toevoegen van een aantal druppels 1 of 4 N NaOH tot een pH van ongeveer 7,2 - 7,5 (d.i. de pH van het cultuur medium) gebracht.

De met virus besmette weefselstukjes bleven gedurende de gehele reproductieperiode van het virus met de diverse stoffen in contact; de hoeveelheid gereproduceerd virus werd met behulp van de infectietiter bepaald.

De stoffen werden in verschillende concentraties onderzocht (zie tabel VIII). De experimenten werden steeds zodanig uitgevoerd, dat per proef de virusreproductie van drie verschillende proefgroepen (drie verschillende stoffen of één stof in drie verschillende concentraties) vergeleken kon worden met die van één controle groep. De bepalingen geschiedden steeds in duplo.

Uit de verdeling van de verschillen tussen duplo bepalingen mag worden geconcludeerd, dat per experiment de waarnemingen practisch normaal zijn verdeeld. Voorts is gebleken, dat de spreidingsbreedte (verschillen van duplo bepalingen) van de duplo's niet gecorreleerd is met de overeenkomstige gemiddelde waarden. Uit deze beide waarnemingen mag worden afgeleid, dat de standaardafwijking bij de verschillende experimenten dezelfde is; als waarde voor deze standaardafwijking in logarithmische maat werd 0,45 gevonden.

De z.g.n. yardstick-methode van Tukey werd vervolgens toegepast om de significantie van de verschillen tussen de diverse behandelingen en de controle te kunnen nagaan. Uit de berekeningen volgde, dat in onze experimenten, waarin steeds vier proeven in duplo werden verricht, alle verschillen van twee gemiddelden (uitgedrukt in negatieve logarithme) die tenminste 1,2 uiteen liggen, significant zijn ($P < 0,05$). In tabel VIII betekent +, dat de infectietiter van de proef significant verschilt van die van de erbijbehorende controle, terwijl met 0 is aangeduid, dat dit verschil niet significant is. Volledige remming van de virusreproductie is met ++ aangegeven.

Zoals in Hoofdstuk III, C, 1. is beschreven, werden de eieren, welke voor de bepaling van de infectietiter werden benut, gedurende 5 dagen bij 35°C. verder bebroed. Van deze eieren ging in de eerste dagen van de incubatie-periode gemiddeld ongeveer 5% verloren. Bij onderzoek naar bacteriële infectie bleek, dat slechts uit een aantal van deze dode eieren bacteriën (staphylococcen, gram positieve en gram negatieve staafjes) konden worden geisoleerd. De sterfte van de bacterie-vrije eieren is mogelijk met de resultaten van Beveridge (153; zie Hoofdstuk III, A.) te verklaren (bij onze proeven werden de eieren, na eerst 8 dagen in horizontale stand te zijn bebroed, gedurende een daaropvolgende periode van 5 dagen in verticale stand geincubeerd).

Behalve in de eerste dagen van de incubatie-periode trad ook sterfte gedurende de 4de en 5de dag op; in tegenstelling tot de eieren welke in het begin dood gingen, werden deze eieren wèl bij de berekening van de infectietiter opgenomen. De sterfte is hier mogelijk het gevolg van de opgetreden virusreproductie (23; zie Hoofdstuk III, A.).

De met Congorood uitgevoerde ei- en Warburg-proeven zijn in de tabellen IX en X samengevat. Met de eerstgenoemde proef werd de virusremmende werking aan de hand van de haemagglutinatietiter en infectietiter van het allantoisvocht onderzocht, met de laatste proef werd het effect aan de hand van de infectietiter van membraansectoren en cultuurmedium tezamen gemeten.

Tabel VIII

Invloed van poly-anionen op de reproductie van bofvirus

Nummer (zie pag. 40)	Stof	Concentratie mol./l x 10^3	Remming van de virusreproductie
I	hexahydro-1,3,5-triazine-1,3,5-trisulfonzuur-kalium	3,90	0
		45,00	++
II	inositolhexasulfaat-natrium	3,60	0
		3,60	0
		36,00	+
		144,00	0 [1]
III	Congorood (Na-zout) [2]	1,58	0
IV	Suramine (Na-zout)	0,22	0
		0,44	0
		0,88	0
		1,76	0
		3,52	++
		7,03	++
V	dextraansulfaat 9/2,6	0,23	0
		0,46	0
		0,92	0
		1,85	0
		7,39	+
		18,48	++
VI	dextraansulfaat 14/1,8	0,44	0
		1,10	0

Tabel VIII (vervolg)

Nummer (zie pag. 40)	Stof	Concentratie mol./l x 10^3	Remming van de virusreproductie
VII	dextraansulfaat 14/1,4	0,22	0
		0,45	0
		1,12	0
		2,24	0
		4,47	0
VIII	dextraansulfaat 14/0,8	1,08	+ [3]
IX	dextraansulfaat 20/2,7	0,47	0
		1,87	0
		4,69	+
		5,62	++
X	dextraansulfaat 20/1,9	0,46	0
		1,86	0
		4,64	0
XI	dextraansulfaat 20/1,1	0,46	0
		1,85	0
		4,62	0
XII	dextraansulfaat 22/0,3	- [4]	-
XIII	dextraansulfaat 30/2,1	0,43	0
		1,71	+
		3,43	+
XIV	Heparine (Na-zout)	0,04	0
		0,08	0
		0,16	+
		0,32	++
		0,62	++
XV	polyphloretine-phosphaat Fl 1056 A	0,17	0
		0,32	+
		0,49	+
		0,65	++
		1,29	++
XVI	polyphloretine-phosphaat Fl 1056 B	0,17	+
		0,32	+
		0,49	++
		0,65	++
		1,30	++
XVII	polyphloretine-phosphaat Fl 1059	0,32	0
		0,64	+
		0,96	+
		1,27	++
XVIII	polyphloroglucinol-phosphaat	0,09	0
		0,17	0
		0,17	+
		0,33	++
		0,67	++
XIX	polyester van 4,4'-dihydroxy-γ,δ-diphenyl-β,δ-hexadiene Dbf 43 db	0,32	+
		0,49	+
		0,66	++
XX	polyoestradiol-phosphaat Pδf F3-814	0,32	0
		0,66	++
		1,33	++

Tabel VIII (vervolg)

Nummer (zie pag. 40)	Stof	Concentratie mol./l x 10^3	Remming van de virusreproductie
XXI	polyacrylzuur	0,8%	0
		1,6%	+
		2,4%	++
XXII	polymethacrylzuur V	0,15	0
		0,31	0
		0,62	0
		0,93	+
XXIII	polymethacrylzuur V 2/c	0,03	0
		0,06	0
		0,13	+
		0,19	++

++ = volledige remming van de virusreproductie
+ = proef en erbij behorende controle verschillen significant ($P < 0,05$).
0 = proef en erbij behorende controle verschillen niet significant ($P > 0,05$).
1) In controle groep geringe virusreproductie.
2) Warburgproef.
3) Reproductie significant hoger t.o.v. controle.
4) Stof onoplosbaar in Tyrode oplossing.

Uit tabel IX volgt, dat Congorood een sterk remmend effect heeft op de haemagglutinatietiter van het allantoisvocht; de haemagglutinatie, waarvan de sterkte bij de controle eieren in verloop van de proefperiode steeds toeneemt, treedt bij de met Congorood behandelde eieren niet op. Het achterwege blijven van haemagglutinatie is echter niet het gevolg van een duidelijke vermindering van de virusreproductie (infectietiter), doch wordt veroorzaakt door een te hoge concentratie van de stof in het allantoisvocht, waardoor de haemagglutinatie reactie niet kon plaats vinden. Hierop zal in Hoofdstuk VIII nader worden ingegaan.

Met de Warburgtechniek blijkt virusreproductie in membraansectoren in aanwezigheid van 0,1% ($1,58 \times 10^{-3}$ mol./l) Congorood oplossing normaal plaats te vinden (zie tabel X).

In tabel XI zijn de onderzochte stoffen in werkzame en niet-werkzame verbindingen onderverdeeld; tevens zijn hierin voor de eerste groep de werkzame concentraties (+), voor de tweede groep de hoogst geteste concentraties opgenomen.

Een vergelijking van de werking van de onderzochte stoffen met hun moleculairgewicht, ladingsdichtheid en type der negatieve ladingsgroep, leidt tot de volgende conclusie (zie tabel VIII):

In de dextraansulfaat reeks neemt de werkzaamheid toe bij verhoging van de ladingsdichtheid; de reproductieremmende stoffen bezitten alle gemiddeld twee of meer sulfaat groepen per glucose eenheid. Er is een aanwijzing, dat bij deze stoffen verhoging van het moleculairgewicht gepaard gaat met vergroting van het reproductieremmende vermogen. Heparine (XIV) heeft met een moleculairgewicht van 16.000 en met 5 sulfaat groepen per tetra-saccharide eenheid een beduidend sterker remmend effect dan de dextraansulfaten.

Van de overige sulfonzuren en zwavelzure esters met laag

Tabel IX
Invloed van Congorood op de virusontwikkeling in bebroede kippeneieren (eitechniek)

1e enting 0,1 cc/all. h.	interval	2e enting 0,1 cc/all. h.	incubatie bij 35°C.	haemagglutinatietiter [1] individuele waarden					gemid.	infectietiter in neg. log [2]
0,1 verd. all. v.	½ uur	ph. zoutopl.	24 uur	0	0	0	0	0	0	> 3,50
idem	½ uur	idem	48 uur	64	8	64	0	0	26	> 4,50
idem	½ uur	idem	72 uur	64	256	256	64	64	141	4,50
idem	½ uur	idem	96 uur	256	256	64	512	2	218	> 5,50
idem	½ uur	idem	120 uur	256	256	1024	128	256	384	5,50
idem	½ uur	idem	168 uur	256	256	256	1024	256	410	6,75
idem	½ uur	½% Congorood	24 uur	volledige remming van de haemagglutinatie						> 3,50
idem	½ uur	idem	48 uur							4,00
idem	½ uur	idem	72 uur							3,50
idem	½ uur	idem	96 uur							4,75
idem	½ uur	idem	120 uur							4,50
idem	½ uur	idem	168 uur							4,55

1) Reciproke waarden.
2) Infectietiter bepaald aan gepoold (5 eieren) allantoisvocht.

Tabel X
Invloed van Congorood op de virusontwikkeling in membraanstukjes (Warburgtechniek)

Proefperiode	Infectietiter/weefsel [1] + cultuurmedium in negatieve logarithme	Cultuurmedium
17½ uur	2,50	4 cc 2% bov. alb.
18½ uur	3,50	idem
19½ uur	2,00	idem
20½ uur	3,00	idem
21½ uur	3,50	idem
22½ uur	2,50	idem
17½ uur	3,50	4 cc 2% bov. alb. + 0,1% Congorood
18½ uur	3,00	idem
19½ uur	3,63	idem
20½ uur	3,33	idem
21½ uur	4,00	idem
22½ uur	3,60	idem

1) 8 membraansectoren per vaatje.

moleculairgewicht zijn hexahydro-1, 3, 5-triazine- 1, 3, 5-trisulfonzuur-kalium, inositolhexasulfaat-natrium en Suramine (resp. 3, 6 en 6 aniongroepen per molecuul) eveneens werkzaam. Voor Congorood (2 aniongroepen per molecuul) kon in de onderzochte concentratie geen virusremmende werking worden aangetoond.

Wat betreft de structuur van de negatieve groep kan worden geconcludeerd, dat de verbindingen behorende tot de polyphosphorzure esters en polycarbonzuren over het algemeen een sterker remmend effect vertonen dan de onderzochte stoffen in de reeks der sulfonzuren en zwavelzure esters. Directe vergelijking is echter niet goed mogelijk, doordat het ladingspatroon van

Tabel XI

Werkzame stoffen		Niet-werkzame stoffen	
Nummer stof (zie pag. 40)	Werkzame concentratie mol./l x 10^3	Nummer stof	Hoogst geteste concentratie [3] mol./l x 10^3
I	45,00	III	1,58
II	36,00	VI 14/1,8	1,10
IV	3,52	VII 14/1,4	4,47
V 9/2,6	7,39	VIII 14/0,8	1,08 [4]
IX 20/2,7	4,69	X 20/1,9	4,64
XIII 30/2,1	1,71	XI 20/1,1	4,62
XIV	0,16	XII 22/0,3	onoplosbaar
XV	0,32		
XVI	0,17 [1]		
XVII	0,64		
XVIII	0,17		
XIX	0,32 [1]		
XX	0,66		
XXI	1,6% [2]		
XXII	0,93		
XXIII	0,13		

1) Werkzame concentratie deze waarde of lager, niet voldoende stof beschikbaar om lagere concentraties te testen.
2) Moleculairgewicht onbekend.
3) Verzadigde oplossing, uitgezonderd III.
4) Stimuleert de virusreproductie.

eerstgenoemde groepen van stoffen niet identiek is aan die van de zwavelzure ester-reeks.

Worden de uitkomsten van tabel VIII vergeleken met die van de tabellen II en VI van Hoofdstuk V, dan blijkt dat alle stoffen die in de onderzochte concentraties de virusreproductie significant remmen in ongeveer dezelfde of hogere concentraties eveneens de ademhaling significant reduceren. Een uitzondering hierop vormen de dextraansulfaten 14/1,8 (VI), 14/1,4 (VII), 20/1,9 (X) en 20/1,1 (XI). Bij gebruik van deze stoffen werd voor de onderzochte concentraties wel significante ademhalingsremming gevonden, zonder dat hierbij virusremming kon worden aangetoond. Dextraansulfaat 14/0,8 (VIII) stimuleert in de onderzochte concentratie significant de virusreproductie; de ademhaling wordt bij ongeveer de helft van deze concentratie niet beinvloed, mogelijk zelfs gestimuleerd. De toename van de ademhaling is echter niet significant. Voor deze verschijnselen kon geen bevredigende verklaring worden gevonden.

Hoofdstuk VII

ONDERZOEK NAAR HET WERKINGSMECHANISME VAN SURAMINE

Bij onderzoekingen betreffende de remming van de virusreproductie wordt veelal met proefdieren of met zich ontwikkelende eieren gewerkt. In beide gevallen is de proefopstelling zodanig, dat de te onderzoeken stof gedurende de gehele onderzoek-periode aanwezig is, terwijl de concentratie ervan (bij gebruik van proefdieren) door herhaalde toediening op pijl wordt gehouden.

Een indruk omtrent de beinvloeding van de verschillende fasen van de infectie- en reproductie-processen (adsorptie aan en binnendringen in de gastheercel, gevolgd door virusreproductie en infectie van andere cellen door naar buiten getreden nieuw gevormd virus) is met de bovenbeschreven techniek niet of moeilijk te verkrijgen.

Met de door ons gevolgde werkwijze (vgl. ook 69 en 93), kan door toediening van de te onderzoeken stof op verschillende tijdstippen in de geschetste cyclus het effect per fase worden beoordeeld en zijn ook eventueel geringe stoornissen in de virusreproductie op te sporen.

Suramine werd voor dit meer gedetailleerde onderzoek uitgekozen, aangezien het bij een goede virusremmende werking een relatief geringe cytotoxiciteit vertoont. Van de stof is uit de literatuur bekend (178), dat zij niet door levende cellen (in casu gistcellen) wordt opgenomen.

Voor een aantal der overige verbindingen werd de aard van de virusremmende werking in een enkele proef orienterend onderzocht.

Voor iedere proef werd een grafiek getekend met op de X-as de tijd in uren en op de Y-as de infectietiter (in negatieve logarithme) als percèntage van het controle punt. Ter verduidelijking is de schaal op de Y-as zo gekozen, dat het 100% punt samenvalt met het 23 uur punt van de reproductiecurve van Wolff (112); dit punt werd in ons onderzoek steeds bepaald.

De hieronder te beschrijven reeks van proeven werd, behoudens de veranderingen, welke in de tekst zijn vermeld, op de in Hoofdstuk III, C, 4. beschreven wijze uitgevoerd. Teneinde de significantie van de verschillen in virusreproductie tussen de diverse behandelingen en de controle te kunnen vast stellen, werd dezelfde maat, waarvan in Hoofdstuk VI gebruik was gemaakt, benut, d. w. z. bij proeven, waarin 4 experimenten in duplo werden verricht zijn alle verschillen significant op het 5% punt, indien de twee gemiddelden tenminste 1,2 (in negatieve logarithme) uiteen liggen. In experimenten, waarin 6 of 7 proeven in duplo werden

verricht, is dit getal resp. 1,33 en 1,39. De punten welke in de grafieken buiten de aangegeven afstand (significantie grens) van het controle punt zijn gelegen, verschillen hiervan significant. Als maat voor de spreiding werd in de grafieken op de Y-as, gerekend vanaf het 100% punt, steeds de standaardafwijking uitgezet. De experimenten werden als volgt uitgevoerd.

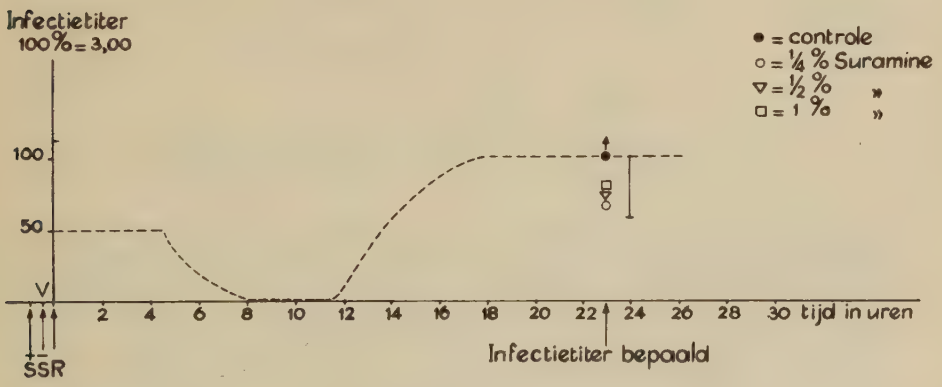
A. *Invloed van Suramine op de adsorptie van virus aan weefsel*

1. Nagegaan werd of vóórbehandeling van het weefsel met Suramine inactivering of blokkering van, voor adsorptie van virus aan weefsel noodzakelijke celreceptoren, tengevolge heeft.

Drie groepen van proefvliesjes werden daartoe gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur behandeld met resp. 1%, $\frac{1}{2}$% en $\frac{1}{4}$% Suramine oplossing; de vliesjes van de controle groep werden gedurende dezelfde tijd in Tyrode oplossing gehouden.

De drie groepen proefvliesjes werden vervolgens direct, dus zonder eerst te zijn gespoeld in Tyrode oplossing, overgebracht in de virussuspensie (30 minuten, eveneens bij kamertemperatuur); ook de controle vliesjes werden met deze virussuspensie behandeld. Hierna werden alle vliesjes in Tyrode oplossing gespoeld en per groep gebracht in rolcultuurbuisjes zonder Suramine.

Drie en twintig uur na aanvang van de proef (tijdstip 0 is het moment, waarop alle vliesjes in de rolcultuurbuisjes en in het rolcultuurapparaat zijn gebracht) werd de infectietiter van proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 8) *.



Figuur 8
Invloed van Suramine op het adsorptie vermogen van chorioallantois membraan

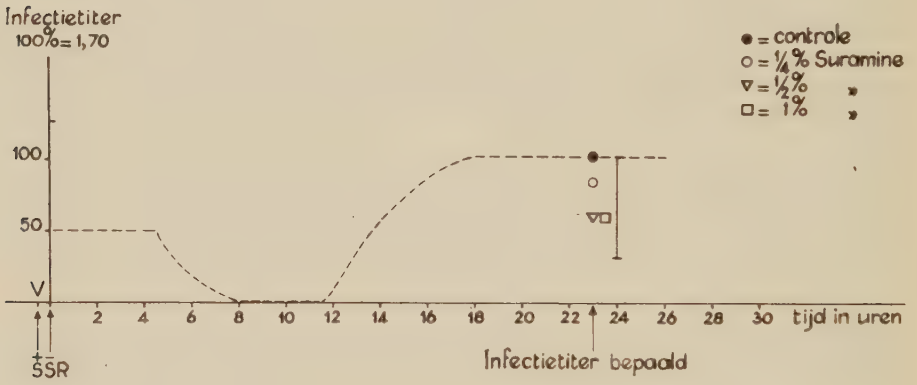
* In figuur 8 t/m 18 betekent V en $\bar{S}$, virus resp. Suramine bij weefsel gevoegd; $\bar{S}$, weefsel uit de Suramine oplossing verwijderd, terwijl met R is aangeduid, dat op dit moment de vliesjes in de rolcultuurbuisjes werden gebracht.

2. Vervolgens werd nagegaan, of aanwezigheid van Suramine tijdens de periode van virusadsorptie van invloed is op het adsorptieproces. Verandering van de ionen samenstelling van het reactiemilieu zou virusadsorptie ongunstig kunnen beinvloeden.

Om dit effect te kunnen bepalen werden drie groepen van proefvliesjes gedurende 30 minuten behandeld met een virussuspensie, waarin Suramine tot een concentratie van resp. 1%, $\frac{1}{2}$% en $\frac{1}{4}$% was opgelost; de vliesjes van de controle groep werden in een virussuspensie zonder Suramine gehouden.

Alle vliesjes werden vervolgens in Tyrode oplossing gespoeld, waarna zij per groep werden overgebracht in rolcultuurbuisjes zonder Suramine.

Na een proefperiode van 23 uur werd de hoeveelheid gereproduceerd virus in proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 9).



Figuur 9
Invloed van Suramine op het adsorptie proces
van bofvirus aan chorioallantois membraan

De gegevens van de onder A.1. vermelde proef geven geen aanwijzing (zie figuur 8), dat bij gebruik van de beschreven proefopstelling Suramine in staat zou zijn de celreceptoren van het weefsel te veranderen; het chorioallantois weefsel neemt ook na behandeling met Suramine oplossing normaal virus op.

Uit het resultaat van de tweede proef (A.2.) volgt, dat adsorptie van virus aan weefsel in aanwezigheid van Suramine ongehinderd plaats gevonden heeft, d.w.z. het lijkt niet waarschijnlijk, dat door verandering in ionen samenstelling van het medium of door vorming van een virus-Suramine complex, het virus duidelijk belemmerd wordt zich aan de cel te hechten (zie figuur 9).

B. *Invloed van het moment van toedienen van Suramine op de virusreproductie*

1. Van 0 - 4 uur

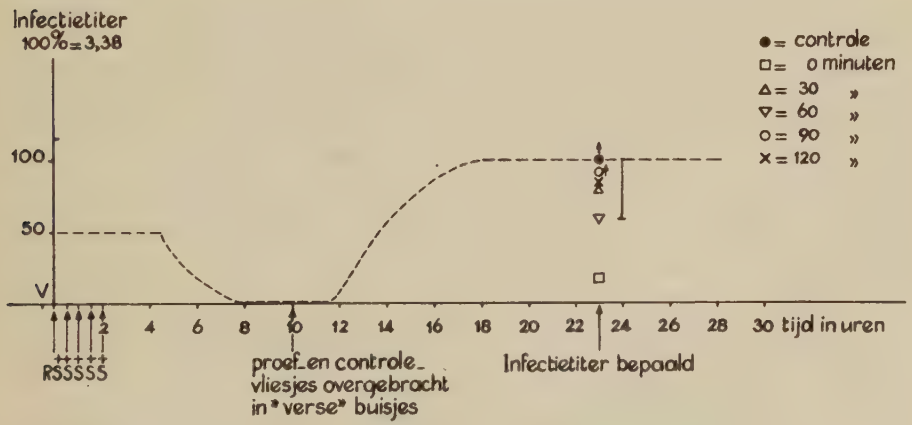
De invloed van Suramine op de penetratie van virus in de cel werd als volgt nagegaan:

Met bofvirus besmette weefselstukjes werden in vijf groepen rolcultuurbuisjes gebracht. Vier van de vijf groepen buisjes waren gevuld met 0,9 cc 2,2% bovine albumine/Tyrode oplossing, in de laatste groep buisjes bevond zich 1 cc cultuurmedium, met daarin opgelost $\frac{1}{2}$% Suramine.

Bij de vier eerstgenoemde groepen van buisjes werd resp. 30, 60, 90 en 120 minuten na aanvang van de proef 0,1 cc 5% Suramine oplossing toegevoegd.

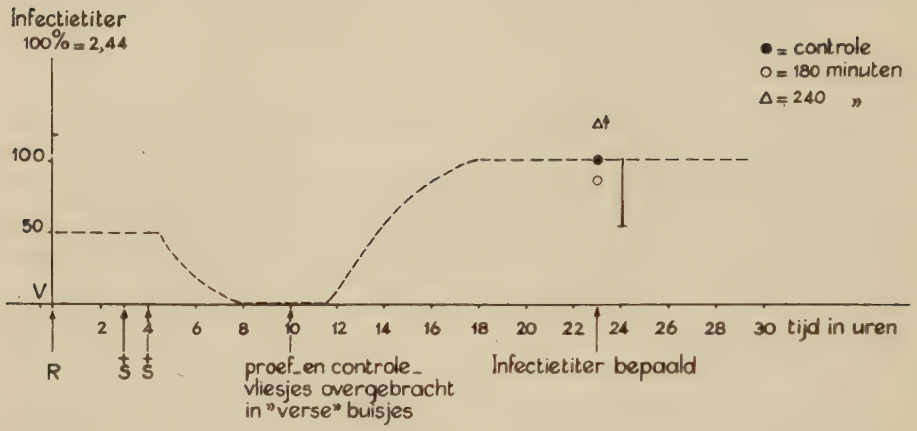
De proef- en controle-vliesjes werden vervolgens na 10 uur, d.w.z. geruime tijd vóór de aanvang van de reproductie-fase, waarin de remmende werking van Suramine bij een volgende proefopstelling (zie B. 3. en B. 3'.) kon worden aangetoond, overgebracht naar „verse" buisjes.

Na een proefperiode van 23 uur werd de hoeveelheid gereproduceerd virus in proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 10).



Figuur 10
Invloed van Suramine op de penetratie van bofvirus in chorioallantois membraan

1'. De zojuist beschreven proef werd op geheel analoge wijze nogmaals herhaald, doch nu werd de Suramine oplossing resp. 180 en 240 minuten na aanvang van de proef aan het cultuurmedium toegevoegd (zie figuur 11).



Figuur 11
Invloed van Suramine op de penetratie
van bofvirus in chorioallantois membraan

Uit de beschreven proeven kan worden afgeleid, dat toevoegen van Suramine op het tijdstip 0, d.w.z. 30 minuten na toedienen van virus aan het weefsel, remming van de reproductie tengevolge heeft; is het interval 60 minuten of langer, dan treedt virusreproductie normaal op (de uitkomsten, bij toediening van Suramine op de tijdstippen 30, 60, 90 en 120 minuten verschillen significant van de uitkomst op het tijdstip 0). In dit laatste geval is het merendeel der virusdeeltjes blijkbaar reeds onbereikbaar geworden voor de inwerking van de Suramine (zie figuur 10). Ook indien Suramine 180 en 240 minuten na aanvang van de proef wordt toegediend, kan geen remming van de virusreproductie worden aangetoond (zie figuur 11).

1''. Naar aanleiding van deze gegevens werd besloten, in de periode van 0 - 60 minuten *na toevoegen van virus aan weefsel* het moment, waarop Suramine niet langer werkzaam is, als volgt nauwkeuriger te bepalen:

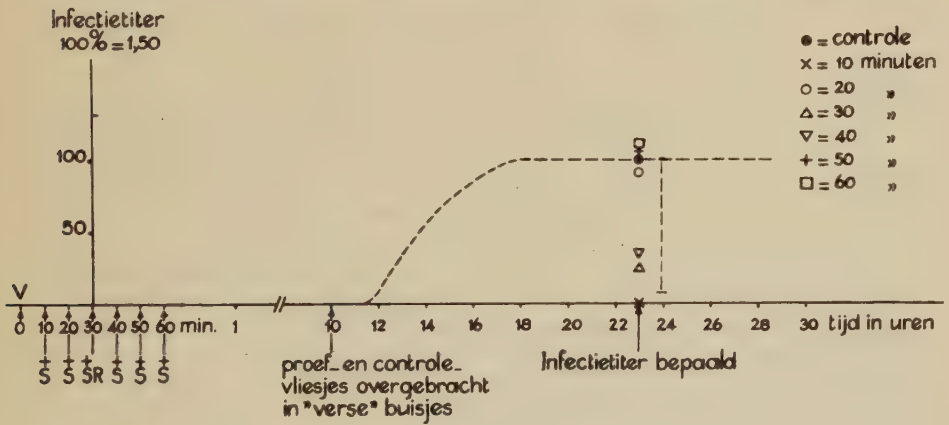
Zeven groepen vliesjes werden gebracht in zeven Petrischaaltjes, gevuld met 5 cc virussuspensie. Bij zes van de schaaltjes werd resp. 10, 20, 30, 40, 50 en 60 minuten na toevoegen van virus een gelijk volume virus-Suramine mengsel (1/10 verdund allantoisvocht met daarin Suramine tot een concentratie van 1% opgelost) gebracht. In het zevende schaaltje bevonden zich de controle vliesjes.

Dertig minuten nadat het virus voor de eerste maal bij de vliesjes was gevoegd, werden de weefselstukjes gewassen en per groep overgebracht in rolcultuurbuisjes. Daartoe werden de vliesjes van groep 1 en 2 resp. 20 en 10 minuten na toevoegen van het virus-Suramine mengsel (Suramine werd resp. 10 en 20 minuten

na virus bij het weefsel gevoegd), na eerst in een ½% Suramine oplossing te zijn gespoeld, gebracht in buisjes gevuld met cultuurmedium, waarin Suramine tot een concentratie van ½% was opgelost (de vliesjes van beide groepen waren op deze wijze 30 minuten in de virussuspensie gebleven). De vliesjes van de derde groep zouden juist op het moment van toedienen van het virus-Suramine mengsel (30 minuten na voor de eerste maal virus was toegevoegd) uit de virussuspensie moeten worden gehaald. Daarom werden deze vliesjes, na eerst in Tyrode oplossing te zijn gewassen, gebracht in buisjes gevuld met cultuurmedium, waarin Suramine tot een concentratie van ½% was opgelost. De vliesjes van de resterende drie groepen (Suramine wordt resp. 40, 50 en 60 minuten na voor de eerste maal toevoegen van virus bij het weefsel gebracht) werden, alvorens in buisjes met cultuurmedium en ½% Suramine te worden gebracht, eerst nog gedurende resp. 10, 20 en 30 minuten in rolcultuurbuisjes zonder Suramine gehouden.

Tien uur na aanvang van de proef werden alle vliesjes, ook de controle vliesjes overgebracht in „verse" buisjes zonder Suramine.

Drie en twintig uur na inzetten van de proef werd de infectietiter van proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 12).


Infectietiter
100% = 1,50
100
50
● = controle
× = 10 minuten
○ = 20 »
△ = 30 »
▽ = 40 »
+ = 50 »
□ = 60 »
V
0 10 20 30 40 50 60 min. 1 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 tijd in uren
S S S R S S S
proef- en controle-vliesjes overgebracht in "verse" buisjes
Infectietiter bepaald

Figuur 12
Invloed van Suramine op de penetratie van bofvirus in chorioallantois membraan

Bij deze proef is het controle punt t.o.v. die van de overige proeven laag. Bij toepassing van de significantie grens zou alleen het 10 minuten punt significant verschillen. Hoewel de getallen niet fraai zijn, is deze proef toch gegeven, aangezien uit de resultaten een aanwijzing kan worden verkregen, dat toevoegen van Suramine 30 en 40 minuten na virus leidt tot een afname van de virusreproductie. Uit het afwijkende 20 minuten punt kan worden afgeleid, dat het moment waarop Suramine blijkbaar niet langer

werkzaam is, b.v. in afhankelijkheid van het gebruikte weefsel, kan varieren.

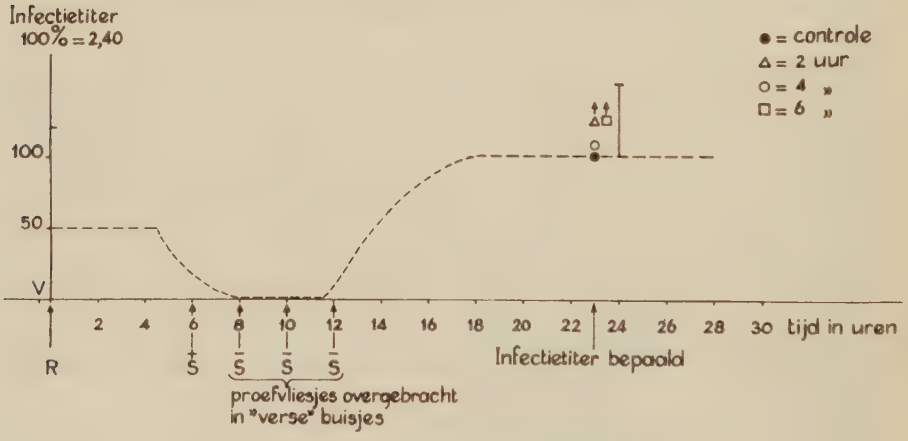
2. Van 6 - 12 uur (eclips-fase)

De vraag of Suramine werkzaam is gedurende de eclips-fase van de virusontwikkeling, werd nagegaan door met virus besmette vliesjes enerzijds te brengen in buisjes gevuld met 0,9 cc 2,2% bovine albumine/Tyrode oplossing (proefbuisjes), anderzijds in buisjes, gevuld met 1 cc 2% bovine albumine/Tyrode oplossing (controle buisjes).

Zes uur na het begin van de proef werd bij alle proefbuisjes 0,1 cc 5% Suramine oplossing gebracht.

Gerekend vanaf dit tijdstip werden de proefvliesjes resp. 2, 4 en 6 uur later overgebracht in „verse" buisjes, gevuld met cultuurmedium zonder Suramine; de controle vliesjes werden niet overgebracht.

De proefperiode bedroeg 23 uur, waarna de infectietiter van proef- en controle-weefsel werd bepaald (zie figuur 13).



Figuur 13
Invloed van Suramine op de virusontwikkeling, indien aanwezig tijdens de eclips-fase

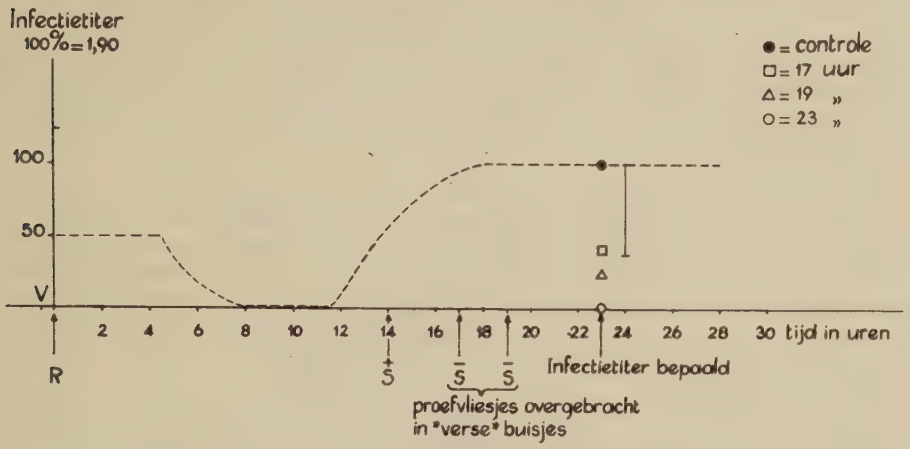
3. Van 14 - 17 uur (reproductie-fase)

De invloed van Suramine op de reproductie van bofvirus, indien de stof aanwezig is tijdens de reproductie-fase van de virusontwikkeling, werd nagegaan met een proef waarvan de opstelling gelijk is aan die van de voorgaande. De Suramine oplossing werd echter nu 14 uur na aanvang van de proef bij de drie groepen proefbuisjes gevoegd.

Drie, resp. vijf uur later werden de vliesjes van steeds één

proefgroep overgebracht in „verse" buisjes; de vliesjes van de laatste proefgroep en die van de controle groep werden niet overgebracht.

Na een proefperiode van 23 uur werd de hoeveelheid virus in proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 14).



Figuur 14
Invloed van Suramine op de virusontwikkeling, indien aanwezig tijdens de reproductie-fase

3'. Met een volgende proef werd nagegaan, of aanwezigheid van Suramine in de periode van 14 - 20 uur van invloed is op het verdere verloop van de virusvermeerdering.

Daartoe werd 14 uur na aanvang van de proef de Suramine oplossing bij drie groepen proefbuisjes gevoegd (eindconcentratie $\frac{1}{2}$%). Op dit tijdstip werd van controle weefsel een infectietiterbepaling ingezet.

Twintig uur na aanvang van de proef werd de hoeveelheid gereproduceerd virus bij één proef- en controle-groep bepaald; de vliesjes van de resterende proef- en controle-groepen werden op dit tijdstip overgebracht in „verse" buisjes. Van deze groepen werd resp. 3 en 6 uur later de infectietiter bepaald (zie figuur 15). In de grafiek werden tevens de resultaten aangegeven van een proef waarbij Suramine 17 uur na aanvang werd toegevoegd en waarbij de infectietiter van proef- en controle-weefsel eveneens bij 20 uur werd gemeten.

Uit de onder B.2. beschreven proef volgt, dat voor Suramine geen invloed op de virusreproductie kan worden aangetoond, indien de stof in de eclips-fase wordt toegediend (zie figuur 13).

Suramine heeft wel effect op de virusreproductie, wanneer de stof tijdens de reproductie-fase aanwezig is (zie figuur 14 en 15).

In proef B.3. en proef B.3'. treedt significante remming op, indien Suramine vanaf 14 uur resp. 5 en 6 uur in contact is geweest met het weefsel. Is Suramine in de proeven aanwezig van

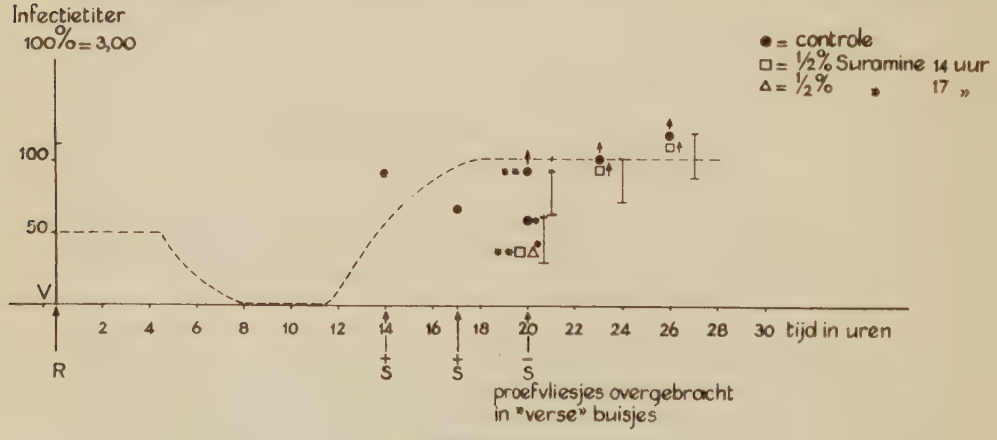
14 - 17 uur of van 17 - 20 uur, dan kan geen remming worden aangetoond.

Het is niet waarschijnlijk, dat de remmende werking tijdens de reproductie-fase berust op een blokkering van het proces van vrijkomen van virus uit de gastheercel. In dat geval zou de hoeveelheid virus in het weefsel gedurende de tijd, dat Suramine in het reactiemedium aanwezig is, steeds moeten toenemen, zodat de infectietiter bij verlenging van deze periode hogere waarden zou moeten vertonen. Bij onze proeven neemt de infectietiter bij aanwezigheid van Suramine gedurende een periode van resp. 3, 5 (proef B. 3.), 6 (proef B. 3'.) en 9 uur (proef B. 3.) juist voortdurend af.

Het lijkt dus mogelijk, dat de geconstateerde reductie van de infectietiter het gevolg is van een remmend effect van Suramine op de slotfase van de virusontwikkeling, waarin de vorming van tot reproductie in staat zijnde virusdeeltjes („volwassen virusdeeltjes") plaats vindt. Dit proces zou in overeenstemming met de voor influenzavirus verkregen resultaten (66), zich moeten afspelen in de oppervlakkige lagen van de celwand.

Wordt in proef B. 3'. het contact met Suramine na een periode van zes uur (14 - 20 uur) opgeheven, dan is de na verloop van drie en zes uur gevormde hoeveelheid virus in de proefvliesjes niet significant verschillend van die in de controle vliesjes. Er treedt evenmin significante afname van de virusreproductie op, indien het met virus besmette weefsel in de periode van 17 - 20 uur resp. 1, 2 en 3 uur in Suramine-bevattend en vervolgens van 20 - 23 uur in normaal cultuurmedium wordt gehouden (niet besproken proef).

4. In het hieronder te beschrijven experiment was de proefopstelling zodanig, dat het weefsel eerst met Suramine werd vóórbe-

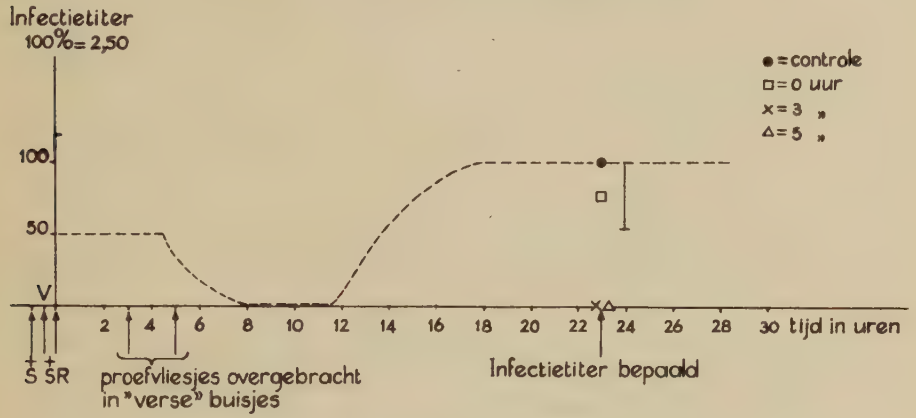


Figuur 15 *
Invloed van Suramine op het verdere verloop van de virusontwikkeling bij aanwezigheid van de stof tijdens de reproductie-fase

* In deze grafiek zijn de bij elkaar behorende proef- en controle-punten d.m.v. resp. 1 en 2 sterretjes aangeduid.

handeld, vervolgens in aanwezigheid van de stof met virus werd besmet, om tenslotte te worden overgebracht in rolcultuurbuisjes met een ½% Suramine. De weefselstukjes bleven gedurende een periode van 3 en 5 uur in dit medium, waarna de proef- en controle vliesjes in „verse" buisjes zonder Suramine werden overgebracht. Behalve deze vliesjes waren er ook, die na virusadsorptie direct in buisjes zonder Suramine werden gebracht.

Na een proefperiode van 23 uur werd de infectietiter van proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 16).



Figuur 16
Invloed van Suramine op de virusontwikkeling, indien de stof zowel een half uur vóór, tijdens, als tot 3 of 5 uur na toevoegen van virus bij het weefsel aanwezig is

Uit de resultaten van de proef blijkt nogmaals, dat Suramine de adsorptie van virus aan weefsel niet beinvloedt; de daaropvolgende penetratie van het virus in de cel wordt daarentegen door de stof wel significant geremd.

Behalve Suramine werd nog een aantal andere stoffen op bovenbeschreven wijze onderzocht (zie tabel XII). Worden de resultaten vergeleken met die van tabel VIII, dan blijkt, dat de uitkomsten in het algemeen parallel verlopen. Voor de in deze proefopstelling werkzaam gebleken stoffen is een remmende invloed op de adsorptie- en/of penetratie-fase aangetoond.

Proeven, die in de loop van dit onderzoek werden verricht en waarvan de uitkomsten aanvankelijk moeilijk waren te verklaren of tot een verkeerde interpretatie leidden, zijn de volgende:

1. Van 0 - 6 uur

In tegenstelling tot de onder B. 1 vermelde proef, waarbij Suramine op varierende tijdstippen na virusadsorptie bij het medium was gevoegd, werden de met virus besmette vliesjes van de drie

Tabel XII

Nummer (zie pag. 40)	Stof	Concentratie mol./l x 10^3	Remming van de virusreproductie
I	hexahydro-1,3,5-triazine-1,3,5-trisulfonzuur-kalium	11,30 22,61 45,22	++ ++ ++
II	inositolhexasulfaat-natrium	40,40	0
IV	Suramine (Na-zout)	0,88 1,76 3,52	0 + ++
V	dextraansulfaat 9/2,6	9,24 18,48	+ 0
IX	dextraansulfaat 20/2,7	2,81 5,62	0 0 [1]
X	dextraansulfaat 20/1,9	2,32	0
XI	dextraansulfaat 20/1,1	2,31	0
XV	polyphlorétine-phosphaat Fl 1056 A	0,17 0,32 0,65	0 0 ++
XVI	polyphloretine-phosphaat Fl 1056 B	0,49	++
XVII	polyphloretine-phosphaat Fl 1059	0,32 0,64	+ ++
XVIII	polyphloroglucinol-phosphaat	0,17 0,33	++ +
XIX	polyester van 4,4'-dihydroxy-γ,δ-diphenyl-β,δ-hexadiene Dbf 43 db	0,17 0,33	0 ++

Voor verklaring van de tekens 0, + en ++, zie tabel VIII.
1) In controle geringe virusreproductie.

proefgroepen bij deze proef direct in het Suramine bevattende cultuur medium gebracht.

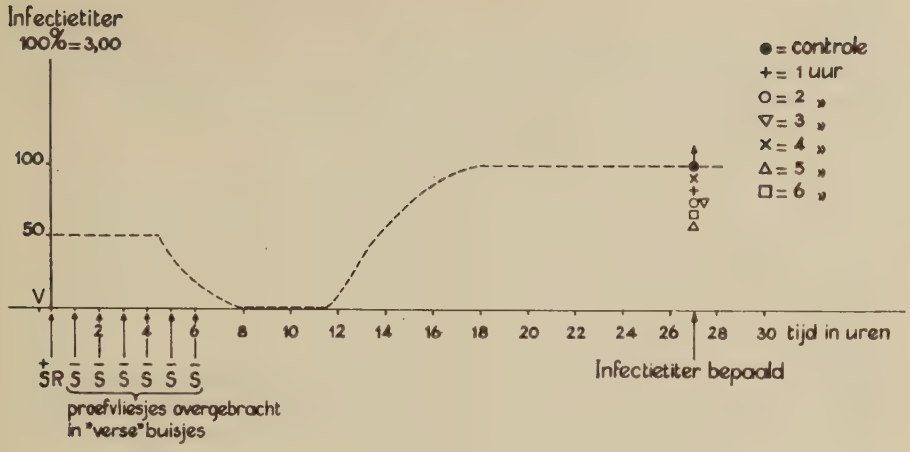
De vliesjes werden vervolgens gedurende resp. 1, 2, 3, 4, 5 en 6 uur in dit cultuurmedium gehouden, waarna zij werden overgebracht in „verse" buisjes zonder Suramine. De controle vliesjes werden niet overgebracht naar andere buisjes.

Na een proefperiode van 27 uur werd de infectietiter van proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 17).

De proef- en controle-punten werden voor de proeven 1. en 2. in enkelvoud bepaald; een statistische bewerking van de uitkomsten werd niet toegepast.

De 1° proef is door de langere proefduur afwijkend van alle overige experimenten.

Uit voorgaande proeven is gebleken dat Suramine, indien het binnen 40 minuten na toedienen van virus wordt toegevoegd en


Infectietiter
100%=3,00
100
50
V
● = controle
+ = 1 uur
○ = 2 „
▽ = 3 „
× = 4 „
△ = 5 „
□ = 6 „
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 tijd in uren
+SR S S S S S S
proefvliesjes overgebracht in "verse" buisjes
Infectietiter bepaald

Figuur 17
Invloed van Suramine op de virusontwikkeling, indien aanwezig in de periode van 0 - 6 uur

vervolgens gedurende een periode van 10 uur bij het weefsel wordt gehouden, in staat is de virusreproductie te remmen.

Bij de zojuist beschreven proef werd Suramine 30 minuten na het virus bij de vliesjes gebracht en tot een periode van zes uur bij het weefsel gehouden. Het leek dus waarschijnlijk dat ook bij deze proefopstelling remming van de virusreproductie zou optreden. Dit bleek echter niet het geval te zijn.

De verklaring voor deze uitkomst kan als volgt zijn:

a. Het moment in de penetratie-fase van het virus, waarop Suramine niet meer werkzaam is, kan, zoals ook gebleken is, varieren.

De mogelijkheid is dus geenszins uitgesloten, dat bij de bovenbeschreven proef het virus in de vliesjes van de proefgroepen b.v. reeds in 20 minuten voldoende ver in de cellen is gedrongen waardoor het beschermd is tegen de werking van Suramine (vgl. óók proef B.1'').

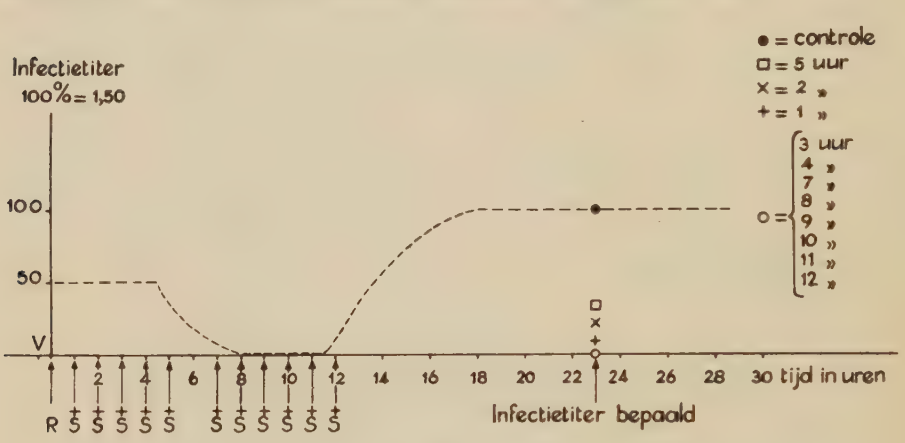
b. Suramine heeft zijn remmende werking op de penetratie van virus in de cel kunnen uitoefenen, doch het effect is door de lange proefduur gemaskeerd (27 uur). De enkele virusdeeltjes die mogelijk aan de inwerking van Suramine zijn ontsnapt, kunnen, mits de proeftijd lang genoeg is, tot een even grote virusreproductie aanleiding geven als een groter aantal virusdeeltjes bij een kortere proefperiode.

2. Van 1 - 12 uur

De hieronder te beschrijven proef werd met hetzelfde doel als de proeven B.1., B.1'. en B.1''. ingezet. De proef onderscheidt zich van de laatstgenoemde experimenten doordat Suramine na toevoegen tot het einde van de proefperiode met het weefsel in

contact bleef. De stof werd elk uur, beginnend bij 1 uur en eindigend bij 12 uur na aanvang van de proef bij het cultuurmedium van de proefbuisjes gebracht.

Na een reproductie periode van 23 uur werd de infectietiter van proef- en controle-weefsel bepaald (zie figuur 18).



Figuur 18
Invloed van Suramine op de virusontwikkeling, indien de stof van 1 - 12 uur na aanvang van de proef wordt toegediend

Uit de resultaten van proef 2. volgt, dat indien Suramine tot en met 12 uur na aanvang van de proef bij het weefsel wordt gevoegd en vervolgens tot het einde van de proefperiode aanwezig blijft, remming van de virusreproductie optreedt, d.w.z. ook wanneer het virus een voorsprong heeft van 12 uur is Suramine nog in staat de reproductie te beinvloeden. De resultaten van proef B.3. en B.3'. doen evenwel vermoeden, dat Suramine in het bovenbeschreven experiment hoofdzakelijk of wel uitsluitend tijdens de reproductie-fase heeft gewerkt.

Hoofdstuk VIII

INVLOED VAN POLY-ANIONEN OP DE HAEMAGGLUTINATIE DOOR VIRUSSEN VAN DE MYXOGROEP

Uit het resultaat van de in Hoofdstuk VI beschreven eiproef met Congorood werd geconcludeerd, dat de stof in sterke mate de haemagglutinatie door het bofvirus remt, doch zonder effect is op de infectieuze eigenschappen van dit virus.

Dit verschijnsel zou verklaard kunnen worden indien wij aannemen, dat Congorood, na inbrengen in de allantoisholte, hierin gedurende de verdere incubatie van de eieren bij 35°C. onveranderd aanwezig blijft, m.a.w. dat de stof niet door de cellen van het chorioallantois membraan wordt opgenomen. Het feit, dat het allantoisvocht van de met Congorood behandelde eieren op het moment van oogsten bijna zonder uitzondering enigszins rood is gekleurd, is hiermee in overeenstemming.

Zoals hierboven werd vermeld, vindt virusreproductie in aanwezigheid van Congorood in het allantoisvocht normaal plaats. Dat desondanks haemagglutinatie achterwege blijft, zou er op duiden, dat Congorood in staat is in hoge verdunningen de haemagglutinatie reactie te remmen. Immers wanneer wij aannemen, dat de stof niet door de cellen wordt opgenomen, noch wordt afgebroken, dan bevindt zich in de allantoisholte, die op de dag van oogsten ongeveer 5 cc allantoisvocht bevat, na inspuiten van de eieren met 0,1 cc ½% Congorood oplossing 0,01% van de stof. Deze concentratie is blijkbaar voldoende, om bij de bepaling van de haemagglutinatietiter van het allantoisvocht tot de hoogste verdunning de agglutinatie te remmen (vgl. tabel IX). Een enkele maal kwam het echter bij soortgelijke proeven voor, dat in de verdunningsreeks het Congorood eerder was „uitverdund" dan het virus; in zulke gevallen waren de eerste verdunningen van de reeks negatief, terwijl in de erop volgende normaal haemagglutinatie optrad.

Het bij in vivo proeven geconstateerde verschijnsel van haemagglutinatieremming door Congorood werd aan een reeks in vitro proeven verder onderzocht. Met Suramine en een aantal der overige onderzochte stoffen werden eveneens dergelijke proeven uitgevoerd. De agglutinatie-remmingsproeven werden niet alleen met het bofvirus, doch ook met de influenzavirussen Liverpool, PR_8 (influenza A) en Lee (influenza B) verricht. Voor Congorood en Suramine werd tevens met enige orienterende proeven de aard van de haemagglutinatieremming nader onderzocht. De agglutinatie-inhibitie proeven werden op de in Hoofdstuk III, C, 3. beschreven wijze uitgevoerd. De experimenten waren als volgt.

A. *Congorood*

1. Invloed op de haemagglutinatie door bof- en influenza-virus

Een aantal verdunningsreeksen, uitgaande van 0,5 cc 1/16% Congorood oplossing (0,896 x 10^{-3} mol./l) werd ingezet.

Aan de ene helft van deze reeksen werden 4 HA eenheden bofvirus, aan de andere helft 4 HA eenheden influenzavirus (Liverpool) per buisje toegevoegd.

Op verschillende tijdstippen hierna, varierende van 0 - 105 minuten werd vervolgens in de buisjes van de verdunningsreeksen kippenerythrocyten (KE) suspensie gebracht.

De temperatuur was vóór toevoegen van de erythrocyten suspensie 4°C., daarna ongeveer 25°C. (zie tabel XIII).

Tabel XIII
Invloed van Congorood op de haemagglutinatie door bof- en influenza-virus

verd. vlst.	bloed [1]	agens [2]	virus [3] 4 HA	tijd min.	minimale haemagglutinatie-remmende concentratie in mol./l x 10^3	temperatuur [4]
0,5 cc phys. zoutopl.	0,5 cc 0,4% KE	0,5 cc 1/16% Congorood	End.	0	0,056	4°C.
idem	idem	idem	Liv.	0	niet geremd	4°C.
idem	idem	idem	End.	15	0,014	4°C.
idem	idem	idem	Liv.	15	niet geremd	4°C.
idem	idem	idem	End.	30	0,014	4°C.
idem	idem	idem	Liv.	30	niet geremd	4°C.
idem	idem	idem	End.	45	0,014	4°C.
idem	idem	idem	Liv.	45	niet geremd	4°C.
idem	idem	idem	End.	75	0,014	4°C.
idem	idem	idem	Liv.	75	niet geremd	4°C.
idem	idem	idem	End.	105	0,014	4°C.
idem	idem	idem	Liv.	105	niet geremd	4°C.

1) Gesuspendeerd in physiologische zoutoplossing.
2) Opgelost in physiologische zoutoplossing.
3) Gesuspendeerd in physiologische zoutoplossing.
4) Vóór toevoeging van erythrocyten, daarna kamertemperatuur.

Zoals uit de tabel blijkt, heeft Congorood geen invloed op de agglutinatie van kippenerythrocyten door influenzavirus. De agglutinatie van de rode bloedlichaampjes door bofvirus wordt daarentegen door de stof sterk geremd; 0,014 x 10^{-3} mol./l Congorood oplossing is nog in staat de haemagglutinatie volledig te remmen. Uit de proef kan bovendien worden opgemerkt, dat Congorood na 15 minuten zijn grootste remmingsactiviteit vertoont. Deze blijkt gedurende het verdere verloop van de proef niet meer te veranderen.

2. Invloed op de rode bloedlichaampjes

Teneinde te kunnen nagaan in hoeverre de erythrocyten veranderd worden door de inwerking van Congorood, werd de volgende proef ingezet:

Er werden twee 10% kippenerythrocyten suspensies gemaakt, n.l. één in physiologische zoutoplossing en één in 1/16% (0,896 x x 10^{-3} mol./l) Congorood oplossing.

De suspensies werden gedurende 4 uur bij kamertemperatuur gehouden, waarna beide suspensies 40 maal werden verdund.

De verdunde suspensies (0,4% kippenerythrocyten, gesuspendeerd in 0,022 x 10^{-3} mol./l Congorood oplossing) werden vervolgens in een haemagglutinatie proef met bofvirus gebruikt (zie tabel XIV).

Tabel XIV
Invloed van Congorood op de rode bloedlichaampjes

erythrocyten susp./ph.z.	agens	interval	temperatuur	haemagglutinatie-titer virus
10% kippenerythrocyten	5 cc 1/16% Congorood	4 uur	± 25°C.	256
10% kippenerythrocyten	5 cc phys. zoutopl.	4 uur	± 25°C.	256

N.B. De proefopstelling zou juister geweest zijn, indien de erythrocyten, na behandeling met Congorood, een aantal malen in physiologische zoutoplossing werden gewassen, teneinde de stof zo goed mogelijk te verwijderen (vgl. overeenkomstige proef met Suramine). De 40-voudige verdunning werd toegepast, om tot die erythrocyten suspensie te komen, die bij de haemagglutinatieremmingsproeven werd benut. Deze verdunning is echter niet voldoende om de concentratie van Congorood tot onder het haemagglutinatie-remmende niveau te brengen (vgl. A.1.). Het feit, dat haemagglutinatie toch normaal heeft plaats gevonden duidt erop, dat Congorood niet storend heeft gewerkt.

Uit tabel XIV volgt, dat zowel de controle als de met Congorood behandelde erythrocyten tot éénzelfde titer door het bofvirus worden geagglutineerd. Het vermogen van de erythrocyten om door bofvirus te worden geagglutineerd, is na behandeling met Congorood onveranderd gebleven.

3. Haemagglutinatie-remmingsproeven met andere erythrocyten

De proefopstelling is gelijk aan die onder A.1.

Aan steeds twee verdunningsreeksen, uitgaande van 1/16% (0,896 x 10^{-3} mol./l) Congorood oplossing werd 30 minuten na virus 0,4% van de volgende erythrocyten suspensies toegevoegd: mensen O-erythrocyten, kippen- en cavia-erythrocyten (zie tabel XV).

Uit tabel XV blijkt, dat zowel met cavia- (CE), als met (zoals reeds bekend was) kippen-erythrocyten (KE) remming van de haemagglutinatie optreedt; 0,007 x 10^{-3} mol./l en 0,0035 x 10^{-3}

mol./l Congorood blijkt de agglutinatie van resp. kippen- en cavia-erythrocyten nog volledig te remmen.

Tabel XV
Invloed van Congorood op de agglutinatie van kippen- en cavia-erythrocyten door bofvirus

verd. vlst.	bloed	agens	virus	minimale haem-agglutinatie-remmende con-centratie in mol./l x 10^3	temperatuur [1]
0,5 cc phys. zoutopl.	0,5 cc 0,4% KE	0,5 cc 1/16% Congorood	4 HA	0,007	± 4°C.
idem	idem	idem	4 HA	0,007	± 4°C.
idem	0,5 cc 0,4% CE	idem	4 HA	0,0035	± 4°C.
idem	idem	idem	4 HA	0,0035	± 4°C.

1) Vóór toevoegen van erythrocyten, daarna kamertemperatuur.

De gebruikte menserythrocyten bleken tegen de verwachting in, niet door het bofvirus te worden geagglutineerd.

4. Invloed op de infectieuze eigenschappen van het bofvirus

De invloed van Congorood op de haemagglutinerende en infectieuze eigenschappen van het bofvirus, werd met de volgende proefopstelling (nogmaals) onderzocht.

Bij 5 cc onverdund allantoisvocht (met virus besmet) werd resp. 0,1 cc 1% Congorood oplossing en 0,1 cc physiologische zoutoplossing gebracht. De mengsels werden gedurende de proef bij 4°C. gehouden.

Vijf minuten, vier en twintig en zes en veertig uur na aanvang van de proef werden de haemagglutinatietiters van de beide suspensies bepaald.

Zes en negentig uur na aanvang van de proef werden beide suspensies tien maal verdund, waarna hiervan 0,1 cc werd ingespoten in twee groepen van vier eieren. Van deze eieren werden 5 dagen later de haemagglutinatietiters (als maat voor de virusreproductie) van het allantoisvocht bepaald (zie tabel XVI).

Uit tabel XVI kan worden geconcludeerd, dat de haemagglutinatietiters van de controle-suspensie gedurende de duur van de proef vrijwel onveranderd blijven; de haemagglutinatietiter van de Congorood-virus suspensie is 5 minuten na aanvang van de proef gelijk aan die van de controle-suspensie, 24 uur na aanvang van de proef zijn de eerste drie verdunningen van de reeks negatief, terwijl 46 uur na het begin van de proef alle verdunningen negatief zijn.

Worden de haemagglutinatietiters van het allantoisvocht van de

Tabel XVI
Invloed van Congorood op de infectieuze eigenschappen van het virusdeeltje

allantois-vocht	agens	interval	haemaggl. titer suspensie	temperatuur [3]	verdunning	0,1 cc /all.h.	haemaggl. titer [1]
5 cc onverd.	0,1 cc phys. zoutopl.	5 min.	64	± 25°C.			
idem	idem	24 uur	64	4°C.			
idem	idem	46 uur	128	4°C.			
idem	idem	96 uur	- [4]	4°C.	1/10	4 eieren	0, 256, 512 [2]
5 cc onverd.	0,1 cc 1% Congorood	5 min.	64	± 25°C.			
idem	idem	24 uur	128 [5]	4°C.			
idem	idem	46 uur	-	4°C.			
idem	idem	96 uur	- [4]	4°C.	1/10	4 eieren	256, 256, 1024, 32

1) Reciproke waarden, bepaald na 5 dagen incubatie bij 35°C.
2) Ei dood.
3) Vóór toevoeging van erythrocyten.
4) Agglutinatietiter niet bepaald.
5) Eerste drie verdunningen negatief.

met de proef- resp. controle-suspensies behandelde eieren vergeleken, dan blijken deze niet wezenlijk van elkaar te verschillen. Het infectievermogen van de virusdeeltjes is onder invloed van de stof niet veranderd.

B. *Suramine*

1. Invloed op de agglutinatie van kippen- en cavia-erythrocyten door bof- en influenza-virus

De proefopstelling is gelijk aan die, welke onder A.1. werd beschreven. Voor de verdunningsreeks werd uitgegaan van 1% Suramine oplossing, het virus (bof, Liverpool, PR_8 en Lee) werd in de aangegeven hoeveelheden HA eenheden toegevoegd, terwijl na een periode van 15 minuten de cavia- resp. kippen-erythrocyten suspensie in de buisjes van de verdunningsreeksen werd gebracht (zie tabel XVII).

Uit tabel XVII kan worden afgeleid, dat de agglutinatie van kippenerythrocyten door het bofvirus onder invloed van Suramine wordt geremd, echter in veel geringere mate dan bij Congorood het geval was; ook de agglutinatie van cavia-erythrocyten wordt door Suramine geremd. De minimale haemagglutinatie-remmende concentratie bedraagt resp. $3{,}50 \times 10^{-3}$ en $1{,}75 \times 10^{-3}$ mol./l Daarentegen wordt de agglutinatie van kippen- en cavia-erythrocyten door influenzavirus onder invloed van Suramine niet beinvloed.

2. Invloed op de rode bloedlichaampjes

Aan 5 cc 0,5% kippenerythrocyten suspensie werd resp. 5 cc

Tabel XVII
Invloed van Suramine op de haemagglutinatie door bof- en influenza-virus

verd. vlst.	bloed	agens	virus HA	tijd min.	minimale haemagglutinatie-remmende concentratie in mol./l x 10^3	temperatuur [1]
0,5 cc phys. zoutopl.	0,5 cc 0,4% KE	0,5 cc 1% Suramine	8, End.	15	3,50	± 25°C.
idem	0,5 cc 0,4% CE	idem	idem	15	1,75	idem
idem	0,5 cc 0,4% KE	idem	64, Liv.	15	niet geremd	idem
idem	0,5 cc 0,4% CE	idem	idem	15	niet geremd	idem
idem	0,5 cc 0,4% KE	idem	32, Lee	15	niet geremd	idem
idem	0,5 cc 0,4% CE	idem	idem	15	niet geremd	idem
idem	0,5 cc 0,4% KE	idem	32, PR8	15	niet geremd	idem
idem	0,5 cc 0,4% CE	idem	idem	15	niet geremd	idem

1) Vóór en ná toevoeging van erythrocyten.

2% Suramine oplossing en 5 cc physiologische zoutoplossing toegevoegd.

De beide suspensies werden daarop gedurende $4\frac{1}{2}$ uur bij kamertemperatuur gehouden.

De met Suramine behandelde erythrocyten werden vervolgens 3 maal in physiologische zoutoplossing gewassen teneinde de Suramine zo goed mogelijk te verwijderen. Van de gesedimenteerde erythrocyten werd tenslotte weer een 0,25% suspensie gemaakt.

Met deze en met de controle erythrocyten werd de haemagglutinatietiter van bofvirus bepaald (zie tabel XVIII).

Tabel XVIII
Invloed van Suramine op de rode bloedlichaampjes

erythrocyten susp. /ph. z.	agens	interval	temperatuur	haemagglutinatie-titer virus
5 cc 0,5% kippenerythrocyten	5 cc 2% Suramine	$4\frac{1}{2}$ uur	± 25°C.	1024
5 cc 0,5% kippenerythrocyten	5 cc phys. zoutopl.	$4\frac{1}{2}$ uur	± 25°C.	512

Uit tabel XVIII volgt, dat in de onderzochte periode Suramine de eigenschap van rode bloedlichaampjes om door bofvirus te worden geagglutineerd, niet heeft aangetast.

3. Invloed op de infectieuze eigenschappen van het bofvirus

De invloed van Suramine op de haemagglutinerende en infectieuze eigenschappen van het bofvirus werd op overeenkomstige wijze als met Congorood onderzocht.

Eén cc onverdund allantoisvocht (met bofvirus besmet) werd

resp. samengebracht met 1 cc 1% (P_1), 1 cc 2% (P_2) Suramine oplossing en 1 cc physiologische zoutoplossing (C).

Vijf, acht en twintig en twee en vijftig uur na aanvang van de proef werden de haemagglutinatietiters van de drie suspensies bepaald. Acht en twintig uur na aanvang van de proef werd van de drie suspensies bovendien nog een infectietiter-bepaling ingezet (zie tabel XIX).

Tabel XIX
Invloed van Suramine op de infectieuze eigenschappen van het virusdeeltje

allantoisvocht	agens	interval	haemagglutinatie-titer suspensie	temperatuur [1]	infectietiter in negatieve logarithme
1 cc onverd.	1 cc 1% Suramine	5 uur	64	4°C	
1 cc onverd.	1 cc 2% Suramine	5 uur	64	4°C.	
1 cc onverd.	1 cc ph. z.	5 uur	64	4°C.	
1 cc onverd.	1 cc 1% Suramine	28 uur	64	4°C.	1,00
1 cc onverd.	1 cc 2% Suramine	28 uur	64 [2]	4°C.	1,00
1 cc onverd.	1 cc ph. z.	28 uur	64	4°C.	3,55
1 cc onverd.	1 cc 1% Suramine	52 uur	-	4°C.	
1 cc onverd.	1 cc 2% Suramine	52 uur	-	4°C.	
1 cc onverd.	1 cc ph. z.	52 uur	64	4°C.	

1) Vóór toevoeging van erythrocyten, daarna kamertemperatuur.
2) Eerst twee verdunningen negatief.

Uit tabel XIX kan worden geconcludeerd, dat de haemagglutinatietiters van de drie groepen tot en met vijf uur na aanvang van de proef onveranderd zijn gebleven; 28 uur na het begin van de proef zijn de eerste twee verdunningen van de reeks P_2 negatief, terwijl 52 uur na aanvang van de proef in geen enkele verdunning van de Suramine reeksen P_1 en P_2 haemagglutinatie optrad. De haemagglutinatietiter van het controlemengsel is van het begin tot het einde van de proef onveranderd gebleven.

Worden de infectietiters van de drie suspensies onderling vergeleken, dan blijken deze in tegenstelling tot de haemagglutinatietiters bij 28 uur na aanvang van de proef duidelijk te verschillen; die van de beide Suramine-virus suspensies zijn aanzienlijk lager dan die van de controle-suspensie. Het vermogen tot reproductie bij het bofvirus wordt door Suramine blijkbaar beinvloed.

Samenvattend leidden de met Congorood en Suramine verkregen resultaten tot het volgende beeld:

	Haemagglutinatie		Infectie	
	Bof	Influenza	Bof (in vitro proeven)	Influenza (in vivo proeven)
Congorood	++ [1]	- [1]	-	+ [2]
Suramine	+ [1]	- [1]	+	- [3]

1) Zowel met kippen- als met cavia-erythrocyten.
2) Vgl. Takemoto en medewerkers (168), echter niet het gevolg van een viricide werking van de stof.
3) Vgl. Neher en Kradolfer (180).

Uit het bovenstaande schema volgt, dat alleen de haemagglutinatie door bofvirus onder invloed van Congorood en Suramine wordt geremd; de haemagglutinatie door influenzavirus wordt door beide stoffen niet beinvloed.

In tegenstelling tot Congorood blijkt Suramine wèl in staat het infectie vermogen van bofvirus aan te tasten. De reproductie van influenzavirus wordt volgens Takemoto en medewerkers (168) door Congorood geremd, door Suramine daarentegen niet beinvloed (180).

4. Invloed van Suramine op de binding virus-erythrocyt

Teneinde te kunnen nagaan of de binding tussen virus en erythrocyt door toevoegen van Suramine reversibel kan worden opgeheven, werd nog de hieronder beschreven proef verricht.

Bij een 1% kippenerythrocyten suspensie werd een gelijke hoeveelheid met bofvirus besmet allantoisvocht gebracht; de onder invloed van het virus optredende haemagglutinatie vond bij 4°C. plaats. De samengeklonterde erythrocyten werden vervolgens bij 1200 g. afgecentrifugeerd, twee maal in overmaat koude physiologische zoutoplossing gewassen en tenslotte in 2 cc koude physiologische zoutoplossing gesuspendeerd. Bij de ene helft van de suspensie werd 1 cc koude physiologische zoutoplossing gevoegd, bij de andere helft 1 cc koude Suramine ($\frac{1}{2}$%) oplossing. De erythrocyten, die tot grote aggregaten waren samengeklonterd, werden goed geschud en vervolgens in de ijskast (4°C.) geplaatst. Gedurende 30 minuten werden zij steeds om de vijf minuten geschud, waarna de buisjes met de beide erythrocyten suspensies gedurende 10 minuten ongeschud bleven staan, teneinde de erythrocyten te laten uitzakken. Geconstateerd werd, dat de agglutinatie van de met Suramine behandelde erythrocyten was opgeheven, terwijl de controle erythrocyten nog steeds waren samengeklonterd. Dit werd met microscopisch onderzoek bevestigd.

De controle, zowel als de met Suramine behandelde erythrocyten werden vervolgens 3 maal in overmaat koude physiologische zoutoplossing gewassen, waarna van elk der erythrocyten een $\frac{1}{2}$% suspensie werd gemaakt. Na uitzakken bleken zowel de proef- als de controle-erythrocyten te zijn geagglutineerd.

Teneinde te kunnen nagaan of deze agglutinatie het gevolg was van aan erythrocyten gehechte virusdeeltjes, werd de zojuist beschreven proef i.p.v. met intacte erythrocyten, met erythrocyten membranen uitgevoerd (de proef werd verricht door Drs. W.G. Braams van het Laboratorium voor Electronenmicroscopie der Rijksuniversiteit te Leiden, voor wiens hulp ik zeer erkentelijk

ben). De erythrocyten membranen met de daaraan gehechte virusdeeltjes (zie figuur 1) werden gedurende een half uur bij 4°C. behandeld met resp. 0,1%, 0,05% en 0,025% Suramine oplossing. Na wassen van de membranen werden praeparaten gemaakt, die vervolgens met het electronenmicroscoop werden onderzocht. Het bleek aldus, dat het aantal virusdeeltjes op de membranen die met 0,1%, 0,05% en 0,025% Suramine oplossingen waren behandeld, niet van het aantal op de controle membranen verschilde.

Het lijkt dus zeer wel mogelijk, dat ondanks het feit dat de agglutinatie van de erythrocyten door $\frac{1}{4}$% Suramine oplossing was opgeheven, het virus zich nog steeds op de erythrocyten bevindt.

C. *Invloed van de andere poly-anionen op de haemagglutinatie door bofvirus*

Voor een aantal der overige onderzochte stoffen werd op overeenkomstige wijze als voor Congorood en Suramine de invloed op de haemagglutinatie nagegaan. Voor de erythrocytensuspensie werden kippenerythrocyten benut; de suspensie werd 30 minuten na toevoegen van virus in de buisjes van de verdunningsreeksen gebracht (zie tabel XX).

Tabel XX

Invloed van poly-anionen op de haemagglutinatie door het bofvirus

Nummer	Stof	Minimale haem-agglutinatie-remmende concentratie in mol./l x 10^6	Opmerkingen
I	hexahydro-1,3,5-triazine-1,3,5-trisulfonzuur-kalium	-	haemaggl. niet geremd idem
II	inositolhexasulfaat-natrium	-	
III	Congorood (Na-zout)	14,0	
IV	Suramine (Na-zout)	3500,0	
V	dextraansulfaat 9/2,6	-	idem
VII	dextraansulfaat 14/1,4	-	idem
VIII	dextraansulfaat 14/0,8	-	idem
IX	dextraansulfaat 20/2,7	-	idem
X	dextraansulfaat 20/1,9	-	idem
XI	dextraansulfaat 20/1,1	-	idem
XIII	dextraansulfaat 20/2,1	-	idem
XIV	Heparine (Na-zout)	-	idem
XV	polyphloretine-phosphaat FL 1056 A	5,0	
XVI	polyphloretine-phosphaat Fl 1056 B	62,5	
XVII	polyphloretine-phosphaat Fl 1059	20,8	
XVIII	polyphloroglucinol-phosphaat	0,3	
XIX	polyester van 4,4'-dihydroxy-γ,δ-diphenyl-β,δ-hexadiene Dbf 43 bd	2,0	
XXI	polyacrylzuur	-	"pseudo-agglutinatie"
XXII	polymethacrylzuur V	-	idem
XXIII	polymethacrylzuur V 2/c	-	idem

Onder invloed van enkele stoffen (XXI, XXII en XXIII) ontstond een z.g.n. „pseudo-agglutinatie", die moeilijk van de echte haemagglutinatie is te onderscheiden; de stoffen XVI en XIX gaven bij hogere concentraties haemolyse van de erythrocyten. Met polyphloroglucinol-phosphaat (XVIII) werd in overeenstemming met Penttinen (162) ook voor het bofvirus in de verdunningsreeksen soms eerst een negatieve zone gevonden. Deze wordt gevolgd door „pseudo-agglutinatie", waarna remming van de haemagglutinatie optrad.

Uit een vergelijking van de gegevens van tabel XX met die van tabel XI volgt, dat van de 16 poly-anionen met virusremmende werking er 6 in staat zijn eveneens de haemagglutinatie te remmen. Voor dergelijke stoffen zou de hypothese kunnen worden afgeleid, dat reproductieremming en haemagglutinatieremming tot stand komen door inactivering van celreceptoren. Voor Suramine werd evenwel aangetoond, dat dit noch voor de haemagglutinatieremming, noch voor de reproductieremming het geval is geweest (receptoren van erythrocyten en gastheercellen werden niet irreversibel veranderd). Het feit, dat voor de andere werkzame stoffen de correlatie reproductieremming en haemagglutinatieremming niet kon worden aangetoond, maakt het waarschijnlijk, dat voor deze stoffen de reproductieremming evenmin het gevolg is geweest van inactivering van celreceptoren (vgl. ook 121).

Hoofdstuk IX

DISCUSSIE EN SAMENVATTING

In dit proefschrift werd de invloed van poly-anionen op de reproductie van bofvirus in chorioallantois membraan nagegaan.

In Hoofdstuk II is een literatuuroverzicht gegeven betreffende de etiologie van bof en de classificatie en de morfologie van het bofvirus. Tevens is uitvoerig ingegaan op de haemagglutinatie door virussen van de Myxogroep. De ten aanzien van dit verschijnsel voor influenzavirus verkregen resultaten vormen een belangrijke achtergrond voor onze discussie en zijn daarom vermeld.

Vervolgens is een overzicht gegeven over het verloop van de reproductie van bof- en influenza-virus in gastheercellen, terwijl de literatuur betreffende de remming van de bofvirusreproductie is samengevat.

In Hoofdstuk III volgt een nauwkeurige beschrijving van het gebruikte materiaal en de toegepaste methodieken.

In hoofdstuk IV is een overzicht gegeven van de op het bofvirus onderzochte poly-anionen. De gegevens uit de literatuur betreffende het effect van een aantal van deze stoffen op de reproductie van andere virussen zijn besproken.

In Hoofdstuk V is de invloed beschreven, die de op virusremming onderzochte stoffen op de ademhaling van chorioallantois membraan uitoefenen, opdat een mogelijke onspecifieke reproductieremmende werking van deze stoffen in de rolcultuurproeven niet over het hoofd zou worden gezien.

Uit dit onderzoek is gebleken, dat een zestiental stoffen met virusremmende werking (zie Hoofdstuk VI), zonder uitzondering eveneens de ademhaling remmen. Andere stoffen daarentegen, hoewel zij in sterk ademhalingsremmende concentratie werden gebruikt, beinvloeden de virusreproductie niet, zodat generaliserend mag worden geconcludeerd, dat de virusremmende werking niet via ademhalingsremming verloopt, doch het gevolg is van een directe invloed van de stoffen op de virusreproductie. De zo juist beschreven verschijnselen werden ook door Eaton en medewerkers (133) bij hun onderzoek naar de invloed van pentamidine en stilbamidine op de reproductie van bof- en influenza-virus geconstateerd, hetgeen de onderzoekers tot een overeenkomstige conclusie voerde.

In Hoofdstuk VI is de werkzaamheid van poly-anionen behorende tot de groep van polysulfonzuren, polyzwavelzure esters, polyphosphorzure esters en polycarbonzuren besproken. Bij toepassing van deze stoffen, die in molecuul-grootte, verdeling en

type van de geladen groepen varieren, is onderzoek naar verband tussen virusremming en structuur mogelijk.

Zo bleken in de dextraansulfaat reeks alleen de stoffen met gemiddeld twee of meer sulfaat groepen per glucose eenheid de virusreproductie significant te remmen. Verhoging van het moleculairgewicht gaat bij deze stoffen gepaard met vergroting van het reproductieremmende vermogen. Eén stof uit de reeks, n.l. die met het minste aantal sulfaat groepen per glucose eenheid (dextraansulfaat 14/0,8), blijkt de virusreproductie significant te stimuleren. Opmerkelijk is, dat de stof in de onderzochte concentratie evenmin de ademhaling remt, mogelijk zelfs stimuleert. Van de overige sulfonzuren en zwavelzure esters zijn Heparine (5 sulfaat groepen per tetra-saccharide eenheid) en Suramine (6 anion groepen per molecuul) het meest actief als remstof.

Sterker (d.w.z. in lagere concentraties) dan de sulfonzuren en zwavelzure esters werken de vervolgens onderzochte polyphosphorzure esters en polycarbonzuren. Daar het ladingspatroon in de onderzochte reeksen van stoffen verschilt, is een directe vergelijking van de activiteit van de negatief geladen groepen als zodanig echter niet mogelijk.

Het virusremmend effect van polysulfonzuren is niet alleen tot het bofvirus beperkt. Zo toonden Neher en Kradolfer (180) bij andere Myxovirussen (influenza A, B en New Castle Disease virus) remming door polysulfonzuur derivaten aan. Remming van de virusontwikkèling (influenza A) door verschillende sulfonzuren werd door Ackermann (181) vermeld.

In Hoofdstuk VII werd getracht een indruk te verkrijgen van het werkingsmechanisme van Suramine door de stof in verschillende fasen van de virusontwikkeling bij het weefsel te voegen. De diverse proeven leiden tot de volgende conclusies:

1) Suramine blijkt niet in staat door verandering van de celreceptoren de *virusadsorptie* te beinvloeden.
2) Toevoeging van Suramine in de *penetratie-fase*, 30 tot 40 minuten na het begin van virusadsorptie, remt de virusreproductie significant. Is het interval 50 tot 60 minuten, of langer, dan kan geen virusremming worden aangetoond.
3) Tijdens de *eclips-fase* van de virusontwikkeling is voor Suramine geen virusremmende werking gevonden.
4) Suramine blijkt de virusreproductie in de *reproductie-fase* te remmen, indien de stof 5 tot 6 uur vanaf de aanvang van deze fase (14 uur) met het weefsel in contact is geweest. Is deze periode korter, dan kan geen remming worden aangetoond.

Uit het bovenstaande volgt, dat Suramine behalve in de penetratie-fase, ook werkzaam is in de reproductie-fase van de virusontwikkeling. Een overeenkomstige werking werd door Ackermann en Maassab (182) voor α-amino-α-p-methoxyphenylmethaansulfonzuur (AMPS) bij het influenzavirus geconstateerd. Gelijktijdige toediening van deze stof en het virus aan chorioallantois weefsel, leidt tot volledige remming van de virusreproductie. Wordt het agens daarentegen 30 minuten na het virus toegediend,

dan vindt virusreproductie normaal plaats; het uittreden van virus uit de cellen wordt evenwel door de stof verhinderd (volgens de auteurs door inactivering van de werking van het virusenzym).

De virusremmende werking van Suramine tijdens de reproductie-fase van het bofvirus is moeilijk in de zin zoals deze bij AMPS plaats vindt, te verklaren. Immers in tegenstelling tot AMPS is voor Suramine een met de tijd toenemende afname van de hoeveelheid virus in het weefsel gevonden. Dit maakt het niet waarschijnlijk, dat het effect van Suramine berust op blokkering van het proces van vrijkomen van virus uit de cel. Hoewel uit de literatuur bekend is, dat Suramine niet in staat is de celwand van erythrocyten (183) en gistcellen (178) te passeren, moet mede op grond van onderzoek naar de remmende werking van deze stof op trypanosomen (vgl. 178) het mogelijk worden geacht, dat dit wèl – doch in geringe mate – het geval is voor de cellen van het chorioallantois membraan. Gezien de grote affiniteit van Suramine voor proteinen (183), zou de remming van de virusontwikkeling in de reproductie-fase verklaard kunnen worden door binding van de stof aan „virus precursors", b.v. niet-infectieuze eiwitcomponenten in een laatste stadium van virus-„rijping". Dat Suramine niet eerder in het proces van virusontwikkeling aangrijpt, wordt waarschijnlijk gemaakt door proef B.3'. in Hoofdstuk VII (zie figuur 15). Uit deze proef blijkt, dat na een inwerkingsperiode van 6 uur (14 - 20 uur) de hoeveelheid gevormd virus drie uur na opheffen van de remmende werking niet verschilt van die van de controle. Het feit, dat het effect van Suramine niet direct is, doch enige tijd vergt, is in overeenstemming met de hypothese, dat slechts een kleine hoeveelheid van de stof de cel binnendringt, welke eerst na een langere latente periode remmend werkt.

Het resultaat, dat bofvirus ook in aanwezigheid van Suramine aan chorioallantois weefsel geadsorbeerd wordt, is in overeenstemming met latere onderzoekingen van Ackermann en medewerkers (184) met AMPS. Hieruit blijkt, dat hoewel adsorptie van influenzavirus aan chorioallantois weefsel bij aanwezigheid van AMPS plaats vindt, de binding losser is dan bij normale adsorptie. Wordt de stof na incubatie van twee uur bij 37°C. uitgewassen, dan volgt normale virusreproductie. Dit is echter niet het geval, indien AMPS gedurende het verdere verloop van de virusontwikkeling in contact met het weefsel blijft. Deze voor influenzavirus verkregen uitkomsten stemmen geheel overeen met die, welke in ons onderzoek voor Suramine en bofvirus werden verkregen (vgl. proef B.4.).

In Hoofdstuk VIII is tenslotte nog een overzicht gegeven van de invloed van poly-anionen op de haemagglutinatie door bof- en influenza-virus. Voor Congorood en Suramine is dit remmende effect met een aantal in vitro proeven nader onderzocht. Daarbij is gebleken dat:

1) Congorood en Suramine de agglutinatie van kippen- en cavia-erythrocyten door bofvirus remmen.
2) De haemagglutinatieremmende werking van deze stoffen niet

berust op een irreversibele verandering van de celreceptoren van kippenerythrocyten.

3) De agglutinatie van kippenerythrocyten door influenzavirus geen invloed van deze stoffen ondergaat.

Uit het onder 1 en 2 vermelde mag worden afgeleid, dat het effect van Congorood en Suramine waarschijnlijk meer op het virus – of op de interactie tussen virus en erythrocyt – dan op de erythrocyten is gericht.

Neher en Kradolfer (180), die eveneens haemagglutinatieremming door polysulfonzuur-derivaten constateerden, wijzen op de mogelijkheid, dat bij de door hen onderzochte poly-anionen de haemagglutinatieremming tot stand komt door verstoring van electrostatische bindingsprocessen (vgl. de „macro-anion" werking op enzymen, zoals deze door Spensley en Rogers, (185) werd geconstateerd).

Puck en medewerkers (89) gelukte het door middel van kationenuitwisselaars de haemagglutinatie door influenzavirus op te heffen. Deze kationenuitwisselaars, die als werkzame groepen sulfonzuur resten bezitten, blijken in staat de virus-erythrocyt binding te verbreken, zonder dat daarbij inactivering van celreceptoren plaats vindt (initiele binding tussen virus en erythrocyt is volgens de onderzoekers reversibel en draagt een electrostatisch karakter). Teneinde dit verschijnsel ook voor het bofvirus te kunnen onderzoeken, werd de in Hoofdstuk VIII, B. 4. vermelde proef verricht.

Het bleek, dat indien virusadsorptie aan erythrocyten in afwezigheid van de stof had plaats gevonden, de stof niet in staat was het virus van de erythrocyten te verwijderen. Immers, bij dergelijke met Suramine behandelde erythrocyten trad, na uitwassen van de stof, spontaan (d.i. zonder toevoegen van virus) agglutinatie op, naar alle waarschijnlijkheid als gevolg van irreversibel aan de erythrocyten gehechte virusdeeltjes; hiermee in overeenstemming zijn de bevindingen van Burnet (70). Met electronenmicroscopisch onderzoek kon worden vastgesteld, dat na behandeling met 0,1% Suramine oplossing inderdaad nog virus op de membranen aanwezig was. Het resultaat van deze orienterende proef maakt het niet waarschijnlijk, dat adsorptie aan erythrocyten bij het bofvirus in tegenstelling tot influenzavirus reversibel kan worden opgeheven.

Het feit, dat bij de proef met intacte erythrocyten de haemagglutinatie verdwijnt ondanks het feit, dat zich zeer waarschijnlijk virus op de erythrocyten bevindt, is mogelijk te verklaren door aan te nemen, dat de haemagglutinatie bij bofvirus veroorzaakt wordt door aggregaten van virusdeeltjes. Door verbreking van de binding tussen virusdeeltjes onderling en niet die tussen virus en erythrocyt, zouden niet geagglutineerde, met virus bedekte erythrocyten kunnen ontstaan. Het voorkomen van bofvirus in aggregaatvorm werd in 1948 door Lind (73) geconstateerd.

Het feit, dat het haemagglutinatieremmend effect van Congorood en Suramine specifiek voor het bofvirus is duidt tenslotte op mogelijke verschillen tussen adsorptie-reactieve groepen bij bof- en influenza-virus.

DISCUSSION AND SUMMARY

This thesis is concerned with an investigation of the influence of poly-anions on the reproduction of mumps virus in chorio-allantoic membrane tissue.

In Chapter II a review of the literature on the etiology of mumps and the classification and morphology of mumps virus is given. Hemagglutination by viruses of the Myxovirus group is amply discussed; since the results obtained for the influenza virus provide such an important background for our discussion, they are given special attention.

Subsequently the course of mumps and influenza virus reproduction in the cell of the host is surveyed and the literature on the inhibition of mumps virus reproduction is summarized.

Chapter III gives a detailed description of the material and methods employed.

Chapter IV deals with the series of poly-anions used in our investigations on mumps virus. The data in the literature concerning the effect of a number of these substances on the reproduction of other viruses are discussed.

Chapter V describes the influence exerted by the virus-inhibiting substances under investigation on the respiration of uniform samples of chorio-allantoic membrane tissue, to be aware of a possible unspecific reproduction-inhibiting effect of these substances in the roller-tube culture experiments.

From this investigation it proved that sixteen substances with a virus-inhibitory effect (see Chapter VI) without exception also inhibit respiration. Some other substances, in contrast, although used in strong respiration-inhibiting concentrations, have no influence on virus reproduction, indicating more severely that the inhibitory effect of the compounds on the virus does not occur as a result of inhibition of respiration, but is effected by a direct influence on virus reproduction. Such phenomena were also reported by Eaton and co-workers (133) in their investigation of the influence of pentamidine and stilbamidine on the reproduction of mumps and influenza viruses, which led the investigators to a similar conclusion.

In Chapter VI the action of poly-anions belonging to the poly-sulfonic acids, polysulfuric acid esters, polyphosphoric acid esters, and polycarboxylic acids is discussed. Variation in molecular size and in distribution and type of the charged groups, enables to investigate the correlation between structure and virus inhibition.

Thus in the dextran sulfate series only the substances with on average two or more sulfate groups per glucose unit appeared to inhibit virus reproduction significantly. Increase in the molecular

weight is paralleled by an increase in the reproduction-inhibiting effect. One substance in the series, viz. with the smallest number of sulfate groups per glucose unit (dextran sulfate 14/0,8), appears to stimulate virus reproduction significantly. It is striking that the substance in the concentration investigated has little inhibitory effect on respiration, or may even stimulate it. Of the remaining sulfonic acids and sulfuric acid esters, heparin (5 sulfate groups per tetra-saccharide unit) and suramin (6 anion groups per molecule) are the most active inhibitors.

A stronger effect (that is to say, in lower concentrations) than that of the sulfonic acids and sulfuric acid esters is found for the polyphosphoric acid esters and polycarboxylic acids investigated. A direct comparision between the activity of the negatively charged groups as such is not, however, possible because of the difference in the charge pattern in the series of substances studied.

The virus-inhibitory effect of polysulfonic acids is not restricted to the mumps virus. Neher and Kradolfer (180) have demonstrated an inhibitory action of polysulfonic acid derivatives on other Myxoviruses (influenza A, B and New Castle Disease virus). Inhibition of virus development (influenza A) by various sulfonic acids was reported by Ackermann (181).

In Chapter VII an attempt is made to gain some insight into the mechanism by which suramin inhibits virus reproduction by addition and removal of the compound at various intervals after the start of the virus reproduction cycle. The experiments led to the following conclusions:

1) Suramin seems unable to influence *virus adsorption* by changes in cell receptors.
2) Introduction of suramin at the *penetration stage*, up till 30 40 minutes after the beginning of virus adsorption, significantly inhibits virus reproduction. When the interval is 50 to 60 minutes or longer, no virus inhibition can be demonstrated.
3) During the *eclipse phase* of virus development, no inhibitory effect was found for suramin.
4) Suramin appears to inhibit virus reproduction during the *reproduction phase* if it has been in contact with the tissue for 5 to 6 hours after the beginning of this phase. No inhibition can be detected if this period is shorter.

It follows from this that suramin is effective in the reproduction phase of virus development as well as in the penetration phase. The same effect was noted by Ackermann and Maassab (182) for α-amino-α-(p-methoxyphenyl)methane sulfonic acid (AMPS) with influenza virus. Simultaneous administration of this substance and virus to chorio-allantois tissue leads to complete inhibition of virus reproduction. If, however, it is administrated 30 minutes after the virus, virus reproduction takes a normal course. AMPS interferes with the liberation of the newly formed

virus from the cell (according to these authors by inactivating the virus enzyme), the virus accumulating inside the cell.

Compared to the effect of AMPS, the action of suramin during the reproduction phase of mumps virus is difficult to explain. In contrast with AMPS, for suramin a reduction in the amount of virus in the tissue is found as the time interval increases. This makes it unlikely that the effect of suramin depends on blocking of the process by which the virus disengages itself from the cell. Though it is known from the literature that suramin is unable to penetrate the cell wall of erythrocytes (183) and yeast cells (178), investigation of its inhibiting effect on trypanosomes (see 178) makes it seem likely, however, that it can do so, although to a limited degree, in the case of the cells of the chorio-allantoic membrane. In view of the great affinity of suramin for proteins (183), the inhibition of virus development in the reproduction phase might be explained by linkage of the substance to virus precursors, for instance non-infectious protein components in a final state of virus maturation. That suramin is not effective earlier in the process of virus development is indicated by experiment B. 3'. in Chapter VII (see figure 15). This experiment shows that, after suramin has been present from 14 to 20 hour of the reproduction cycle, the amount of virus found three hours after removal of the inhibitor did not differ from that of the control. The fact that the effect of suramin is not instantaneous but requires a time interval is in agreement with the hypothesis that only a small amount of the substance penetrates the cell and exerts its inhibitory effect only after an extended latent period.

The conclusion that mumps virus is adsorbed to chorio-allantoic tissue even in the presence of suramin agrees with later investigations made with AMPS by Ackermann and co-workers (184). These show that although adsorption of influenza virus on chorio-allantoic tissue does take place, the binding is weaker than in normal adsorption. If after an incubation period of two hours at 37°C., the substance is washed out, normal reproduction takes place. This is not the case, however, if AMPS remains in contact with the tissue during the subsequent course of virus development. These results for influence virus are completely concurrent with those obtained in our investigation of suramin and mumps virus (compare experiment B. 4. in chapter VII).

In Chapter VIII a review of the influenza of poly-anions on hemagglutination by mumps and influenza virus is given. The inhibitory effect of congored and suramin was investigated more in detail with a number of *in vitro* experiments. These showed that:

1) Congored and suramin inhibit the agglutination of chicken and guinea pig erythrocytes by mumps virus.
2) The hemagglutination-inhibiting effect of these substances it not due to an irreversible change in the cell receptors of chicken erythrocytes.
3) The agglutination of chicken erythrocytes by influenza virus is not influenced by these substances.

It may be assumed from points 1) and 2) that the action of con-

gored and suramin is probably more on the virus- or on the interaction between virus and erythrocyte – than on the erythrocyte itself.

Neher and Kradolfer (180), who also found hemagglutination-inhibition by polysulfonic acid derivatives, indicate the possibility that the poly-anions they investigated bring about the hemagglutination-inhibition by interfering with electrostatic attachment processes (compare the „macro-anion" effect on enzymes as demonstrated by Spensley and Rogers (185)).

Puck and co-workers (189) were successful in annihilating the hemagglutination of influenza virus by the use of cation exchange resins. These cation exchange resins, with sulfonic acid residues as active groups, appear to be able to break the virus-erythrocyte linkage without a resultant inactivation of cell receptors (initial linkage between virus and erythrocyte is, according to these authors, reversible and is of electrostatic nature). In order to investigate this phenomenon for mumps virus, the experiment described in Chapter VIII, B.4. was carried out.

It appeared that if virus adsorption on erythrocytes has occurred in its absence, suramin was unable to separate the virus from the erythrocytes. Such erythrocytes treated with suramin and subsequently freed from it showed spontaneous agglutination (that is, without addition of virus), in all probability due to virus particles irreversibly attached to the erythrocytes (in agreement with the findings of Burnet (70)). Investigation with the electron microscope showed that after treatment with 0,1% suramin solution, virus was still present indeed on the membrane. The result of this preliminary experiment suggests that it is likely that, in contrast with influenza virus, after the adsorption of mumps virus on erythrocytes the virus particles cannot be detached from them.

The fact that in experiments with intact erythrocytes hemagglutination disappears although more probably virus is present on the erythrocytes, possibly may be explained by assuming that in mumps virus, hemagglutination is caused by aggregations of virus particles. Breaking of the attachment between the virus particles themselves and not that between virus and erythrocytes, might explain the existence of unagglutinated, virus-covered erythrocytes. The occurrence of mumps virus in such aggregated forms was reported by Lind (73).

The hemagglutination-inhibiting effect of congored and suramin being specific for mumps virus, finally is pointing to possible differences between adsorptive groups in mumps and influenza virus.

LITERATUUR

1. Stengel, A. (1936), Amer. J. Med. Sci., 191, 340.
2. Burnet, F. M. (1946), Virus as Organism, Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
3. Spooner, E. T. C. (1953), Brit. Med. Bull., 9, 212.
4. Burnet, F. M. (1955), Principles of Animal Virology, New York, Academic Press Inc. Publishers.
5. van Rooyen, C. E. & Rhodes, A. J. (1948), Virus Diseases of Man, 2nd ed., New York, Thomas Nelson & Sons.
6. Rivers, T. M. (1952), Viral and Rickettsial Infections of Man, 2nd ed., The National Foundation for Infantile Paralysis, Inc. U. S. of America.
7. Granata, S. (1908), Bull. Inst. Pasteur, 6, 1093.
8. Habel, K. (1945), Publ. Hlth. Rep., Wash., 60, 201.
9. Levens, J. H. & Enders, J. F. (1945), Science, 102, 117.
10. Beveridge, W. I. B., Lind, P. E. & Anderson, S. G. (1946), Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 24, 15.
11. Henle, G. & McDougall, C. L. (1947), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 209.
12. Kilham, L. (1948), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 99.
13. Hook, E. W., Poole, S. O. & Friedewald, W. F. (1949), J. Inf. Dis., 84, 230.
14. Kilham, L. (1951), J. Am. Med. Assoc., 146, 1231.
15. Kilham, L. (1949), Am. J. Dis. Child., 78, 324.
16. Burnet, F. M. (1950), Lancet I, 1059.
17. Feiling, A. (1914-15), Quart. J. Med., 8, 255.
18. Gordon, J. E. & Kilham, L. (1949), Amer. J. Med. Sci., 218, 338.
19. Andrewes, C. H., Bang, F. B. & Burnet, F. M. (1955), Virology 1, 176.
20. Weil, M. L., Beard, D., Sharp, D. G., Beard, J. W. (1948), J. Immunol., 60, 561.
21. Weil, M. L., Beard, D., Sharp, D. G., Beard, J. W. (1948), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68, 308.
22. Elford, W. J., Chu, C. M., Dawson, I. M., Dudgeon, J. A., Fulton, F., Smiles, J. (1948), Brit. J. Exp. Path., 29, 590.
23. Enders, J. F. & Levens, J. H. (1948), Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases, Publication Office, American Public Health Association, 1790, New York City.
24. Dawson, I. M. & Elford, W. J. (1949), J. Gen. Microbiol., 3, 298.
25. Ray, B. G. & Swain, R. H. A. (1954), J. Path. Bact., 67, 247.

25a. Valentine, R.C. & Isaacs, A. (1957), J.Gen. Microbiol., 16, 680.
26. Burnet, F.M. (1948), Lancet, I, 7.
27. Hirst, G.K. (1942), J.Exp. Med., 76, 195.
28. Burnet, F.M. (1951), Physiol. Rev., 31, 131.
28a. Burnet, F.M. (1951), Proc. Roy. Soc. London, 138, series B, 47.
29. Burnet, F.M. (1952), Ann. Rev. Microbiol,, 6, 229.
30. Gottschalk, A. (1957), Physiol. Rev., 37, 66.
31. Briody, B.A. (1948), J. Immunol., 59, 115.
32. Hirst, G.K. (1948), J.Exp. Med., 87, 315.
33. Burnet, F.M., McCrea, J.F., Stone, J.D. (1946), Brit. J. Exp. Path., 27, 228.
34. McCrea, J.F. (1947), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 25, 127.
35. Francis, T. (1947), J. Exp. Med., 85, 1.
36. Anderson, S.G. (1948), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 26, 347.
37. Deibel, R. (1957), Klin. Wochenschr., 35, 265.
37a. Green, R.H. & Woolley, D.W. (1947), J. Exp. Med., 86, 55.
38. Beveridge, W.I.B. & Lind, P.E. (1946), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 24, 127.
39. Gottschalk, A. & Lind, P.E. (1949), Nature, 164, 232.
40. Gottschalk, A. & Lind, P.E. (1949), Brit. J. Exp. Path., 30, 85.
41. Gottschalk, A. (1951), Nature, 167, 845.
42. Blix, G. (1936), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 240, 43.
43. Blix, G., Svennerholm, L., Werner, I. (1952), Acta Chem. Scand., 6, 358.
44. Klenk, E. & Lauenstein, K. (1952), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 291, 147.
45. Klenk, E. & Faillard, H. (1954), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 298, 230.
46. Klenk, E., Faillard, H., Lempfrid, H. (1955), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 301, 235.
47. Gottschalk, A. (1957), Biochim. et Biophys. Acta, 23, 645.
48. Bogoch, S. (1957), Virology, 4, 458.
49. Klenk, E. & Lempfrid, H. (1957), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 307, 278.
50. Howe, C., Rose, H.M., Schneider, L. (1957), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96, 88.
51. Zilliken, F., Werner, G.H., Silver, R.K., György, P. (1957), Virology, 3, 464.
52. Gottschalk, A. (1956), Biochim. et Biophys. Acta, 20, 560.
53. Kuhn, R. & Brossmer, R. (1956), Chem. Ber., 89, 2471.
54. Gottschalk, A. & Perry, B.T. (1951), Brit. J. Exp. Path., 32, 408.
55. Tamm, I. & Horsfall, Jr. F.L. (1952), J. Exp. Med., 95, 71.
56. Klenk, E. & Uhlenbruck, G. (1957), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 307, 266.
57. Böhm, P., Ross, J., Baumeister, L. (1957), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 307, 284.
58. Hirst, G.K. (1943), J. Exp. Med., 78, 99.
59. Stone, J.D. (1948), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 26, 49.

60. Stone, J. D. (1948), Austr. J. Exp. Med. Sci., 26, 287.
61. Fazekas de St. Groth, S. (1948), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 26, 29.
62. Liu, O. C. & Henle, W. (1951), J. Exp. Med., 94, 269.
63. Schlesinger, R. W. & Karr, H. V. (1956), J. Exp. Med., 103, 333.
64. Henle, W. (1953), Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 18, 35.
65. Wolff, H. L. (1957), J. Path. Bact., 73, 337.
66. Hoyle, L. (1950), J. Hyg., 48, 277.
67. Fazekas de St. Groth, S. (1948), Nature, 162, 294.
68. Fazekas de St. Groth, S. & Graham, D. M. (1949), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 27, 83.
69. Ackermann, W. W. & Francis, T. (1954), Advances Virus Res., 2, 81.
70. Burnet, F. M. (1946), Brit. J. Exp. Path., 27, 244.
71. Stone, J. D. (1947), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 25, 137.
72. Burnet, F. M. (1945), Austr. J. Sci., 8, 81.
73. Lind, P. E. (1948), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 26, 93.
74. Anderson, S. G. (1947), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 25, 163.
75. Burnet, F. M. & Anderson, S. G. (1946), Brit. J. Exp. Path., 27, 236.
76. Morgan, H. R., Enders, J. F., Wagley, P. F. (1948), J. Exp. Med., 88, 503.
77. Chu, L. W. & Morgan, H. R. (1950), J. Exp. Med., 91, 393.
78. Chu, L. W. & Morgan, H. R. (1950), J. Exp. Med., 91, 403.
79. Morgan, H. R. (1950), Bact. Proc., 81.
79a. Moberly, M. L., Marinetti, G. V., Witter, R. F., Morgan, H. R. (1958), J. Exp. Med., 107, 87.
80. Sagik, B. P. & Levine, S. (1954), Bact. Proc., 71.
81. Sagik, B. P. & Levine, S. (1957), Virology, 3, 401.
82. Burnet, F. M. & Lind, P. E. (1950), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 28, 129.
83. Burnet, F. M. (1950), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 28, 299.
84. Henle, G., Henle, W., Harris, S. (1947), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 64, 290.
85. Enders, J. F. & Cohen, S. (1942), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50, 180.
86. Davenport, F. M. & Horsfall, Jr., F. L. (1948), J. Exp. Med., 88, 621.
87. Lowell, F. C. & Buckingham, M. (1948), J. Immunol., 58, 229.
88. Burnet, F. M. & Edney, M. (1952), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 30, 105.
89. Puck, T. T. & Sagik, B. P. (1953), J. Exp. Med., 97, 808.
90. Levine, S. & Sagik, B. P. (1954), Bact. Proc., 89.
91. Levine, S. & Sagik, B. P. (1956), Virology, 2, 57.
92. Tolmach, L. J. (1957), Advances in Virus Res., 4, 63.
93. Horsfall, Jr. F. L. & Tamm, I. (1957), Ann. Rev. Microbiol., 11, 339.
94. Hershey, A. D. & Chase, M. (1952), J. Gen. Physiol., 36, 39.
95. Gierer, A. & Schramm, G. (1956), Nature, 177, 703.

96. Burnet, F. M. & Lind, P. E. (1951), J. Gen. Microbiol., 5, 60.
97. Burnet, F. M. & Lind, P. E. (1951), J. Gen. Microbiol., 5, 67.
98. Hoyle, L. (1948), Brit. J. Exp. Path., 29, 390.
99. Hoyle, L. (1952), J. Hyg., 50, 229.
100. Hoyle, L., Jolles, B., Mitchell, R. G. (1954), J. Hyg., 52, 119.
101. Hoyle, L. & Frisch-Niggermeyer, W. (1955), J. Hyg., 53, 474.
102. Frisch-Niggermeyer, W. & Hoyle, L. (1956), J. Hyg., 54, 201.
103. Hoyle, L. & Finter, N. B. (1957), J. Hyg., 55, 290.
104. Horsfall, Jr. F. L. (1955), J. Exp. Med., 102, 441.
105. Ginsberg, H. S., Goebel, W. F., Horsfall, Jr. F. L. (1948), J. Exp. Med., 87, 385.
106. Ginsberg, H. S. & Horsfall, Jr. F. L. (1949), J. Exp. Med., 90, 393.
107. Lundbäck, H. (1955), Acta Path. Microbiol. Scand., 37, 103.
108. Weller, Th. & Enders, J. F. (1948), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 124.
109. Burr, M. M., Campbell, M. E., Morgan, J. F., Nagler, F. P. (1954), Canad. J. Microbiol., 1, 158.
110. Watson, B. K. (1952), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 222.
110a. Watson, B. K. (1952), J. Exp. Med., 96, 653.
111. Watson, B. K. & Cheever, F. S. (1955), J. Immunol., 75, 161.
112. Wolff, H. L. (1955), Nature, 176, 604.
113. Perry, V. P., Evans, V. J., Earle, W. R., Hyatt, G. W., Betell, W. C. (1956), Am. J. Hyg., 63, 52.
114. Henle, G., Deinhardt, F., Girardi, A. (1954), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87, 386.
115. Henle, G. & Deinhardt, F. (1955), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 556.
116. Henle, G. & Deinhardt, F. (1957), J. Immunol., 79, 60.
117. Coons, A. H. & Kaplan, M. H. (1950), J. Exp. Med., 91, 1.
118. Coons, A. H., Snyder, J. C., Cheever, F. S., Murray, E. S. (1950), J. Exp. Med., 91, 31.
119. Johnson, C. D. & Goodpasture, E. W. (1936), Am. J. Path., 12, 495.
120. Ginsberg, H. S., Goebel, W. F., Horsfall, Jr. F. L. (1947), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 99.
121. Ginsberg, H. S., Goebel, W. F., Horsfall, Jr. F. L. (1948), J. Exp. Med., 87, 411.
122. Ginsberg, H. S. & Horsfall, Jr. F. L. (1948), Bull. N. Y. Acad. Med., 24, 541.
123. Eaton, M. D., Cheever, F. S., Levenson, C. G. (1951), J. Immunol., 66, 463.
124. Eaton, M. D., Levenson, C. G., Perry, M. (1952), J. Immunol. 68, 1.
125. Green, M. & Stahmann, M. A. (1953), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 852.
126. Green, M. & Stahmann, M. A. (1954), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87, 507.

127. Tamm, I. (1954), Science, 120, 847.
128. Tsuyuki, E., Tsuyuki, H., Stahmann, M.A. (1956), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91, 318.
129. McLinians, W.F., Underwood, G.E., Slater, E.A., Davis, E.V., Siem, R.A. (1957), J. Immunol., 78, 104.
130. Dickinson, L. & Thompson, M.J. (1957), Brit. J. Pharm. Chem., 12, 66.
131. McClelland, L. & van Rooyen, C.E. (1949), Canad. J. Res., 27, 177.
132. Eaton, M.D., Magasanik, B., Perry, M.E., Karibian, D. (1951), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77, 505.
133. Eaton, M.D., Perry, M.E., Levenson, C.G., Gocke, I.M. (1952), J. Immunol., 68, 321.
134. Cushing, R.T. & Morgan, H.R. (1952), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 497.
135. Eaton, M.D. (1954), Arch. Ges. Virusf., 5, 53.
136. Dunham, W.B. (1954), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87, 431.
137. Gardner, B.J. & Morgan, H.R. (1952), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 133.
138. Morimoto, M. & Morgan, H.R. (1954), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 86, 795.
139. Schmuttermeier, E., Swoboda, W., Thalhammer, O. (1950), Wien. Klin. Wochenschr., 62, 979.
140. Ghalioungui, P. (1950), Lancet, I, 75.
141. Homer, L. & Donovan, W.N. (1952), J. Amer. Med. Assoc., 150, 465.
142. Nickerson, G. & Worden, E.M. (1952), Canad. Med. Assoc. J., 66, 17.
143. Sutliff, W.D. & Barnes, Z.B. (1952), J. Lab. Clin. Med., 40, 951.
144. Sutliff, W.D. & Barnes, Z.B. (1953), A.M.A. Arch. Int. Med., 93, 68.
145. Hoyne, A.L., Diamond, J.H., Christian, J.R. (1949), J, Amer. Med. Assoc., 140, 662.
146. Norton, R.J. (1950), J. Amer. Med. Assoc., 143, 172.
147. Hall, W.T. & Kileen, R.N.F. (1954), U.S. Armed Forces Med. J., 5, 332.
148. Solem, J.H. (1954), Acta Med. Scand., 149, 341.
149. Hurst, E.W. & Hull, R. (1956), Pharm. Rev., 8, 199.
150. Matthews, R.E.F. & Smith, J.D. (1955), Advances Virus Res., 3, 51.
151. Findlay, G.M. (1951), J. Pharm. Pharmacol., 3, 193.
152. Beveridge, W.I.B. & Burnet, F.M. (1946), Med. Res. Counc. Spes. Rep., no. 256.
152a. Woodruff, A.M. & Goodpasture, E.W. (1931), Amer. J. Path., 7, 209.
153. Beveridge, W.I.B. (1947), Science, 106, 324.
154. Klöne, W. (1952), Klin. Woch., 30, 782.
155. Dulbecco, R. (1955), Physiol. Rev., 35, 301.
156. Reed, L.J. & Muench, H. (1938), Amer. J. Hyg., 27, 493.

156a. Luria, S. E. (1954), General Virology, New York, J. Wiley; London, Chapman and Hall.
157. Donald, H. B. & Isaacs, A. (1954), J. Gen. Microbiol. 10, 457.
158. Isaacs, A. & Donald, H. B. (1955), J. Gen. Microbiol. 12, 241.
159. Isaacs, A. (1957), Advances Virus Res., 4, 111.
160. Salk, J. E. (1944), J. Immunol., 49, 87.
161. Brand, G., Lippelt, H., Müller, F. (1954), Zeitschr. f. Hyg., 139, 293.
162. Penttinen, K. (1956), Ann Med. Exp. Biol. Fenn., 34, 88.
162a. Zwart, A. G. (1952), Biochim. Biophys. Acta 9, 104.
163. Tolmach, L. J. (1957), Advances Virus Res., 4, 63.
164. Puck, T. T. (1953), Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 18, 149.
165. Puck, T. T., Garen, A., Cline, J. (1951), J. Exp. Med., 93, 65.
165a. Garen, A. & Puck, T. T. (1951), J. Exp. Med., 94, 177.
166. Tolmach, L. J. & Puck, T. T. (1952), J. Amer. Chem. Assoc., 74, 5551.
167. Puck, T. T. & Tolmach, L. J. (1954), Arch. Biochem. Biophys., 51, 229.
168. Takemoto, K. K., Robbins, M. L., Smith, P. K. (1954), J. Immunol. 72, 139.
169. Hurst, E. W., Melvin, P., Peters, J. M. (1952), Brit. J. Pharm. Chem., 7, 455, 473.
170. Groupé, V., Rake, G. (1947), J. Immunol., 57, 17.
171. Penttinen, K. (1957), Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 35, 331.
172. Ricketts, C. R. (1952), Biochem. J., 51, 129.
173. Mathews, M. B. & Dorfman, A. (1955), Physiol. Rev., 35, 381.
174. Ferraro, W., Costa, E., Pellegrini, P. (1948), Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 24, 808.
175. Lahelle, O. & Horsfall, Jr. F. L. (1949), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 547.
176. Umbreit, W. W., Burris, R. H., Stauffer, J. S. (1957), Manometric Technics, 3d ed., Minneapolis, Burgess Publ. Co.
177. Ackermann, W. W. (1951), J. Biol. Chem., 189, 421.
178. Town, B. W., Wills, E. D., Wilson, E. J., Wormall, A. (1950), Biochem. J., 47, 149.
179. Herrmann-Erlee, M. P. M. & Wolff, H. L. (1957), Arch. Int. Pharmacodyn., 110, 340.
180. Neher, R. & Kradolfer, F. (1955), Zeitschr. f. Naturf., 10 b, 191.
181. Ackermann, W.W. (1952), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80, 362.
182. Ackermann, W.W. & Maassab, H. F. (1954), J. Exp. Med., 99, 105.
183. Wilson, E. J. & Wormall, A. (1949), Biochem. J., 45, 224.
184. Ackermann, W.W., Ishida, N., Maassab, H. F. (1955), J. Exp. Med., 102, 545.
185. Spensley, P. C. & Rogers, H. J. (1954), Nature, 173, 1190.

CURRICULUM VITAE

Teneinde te voldoen aan de wens van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, volgt hier een overzicht van mijn academische studie.

In 1948 behaalde ik het diploma H.B.S.-B aan de Meisjes H.B.S. te Leiden. In het zelfde jaar begon ik mijn studie in de biologie aan de Rijksuniversiteit te Leiden. In 1952 slaagde ik voor het candidaatsexamen biologie en in 1955 voor het doctoraal examen biologie met hoofdvak dierkunde en bijvakken plantkunde en landbouwdierkunde.

Voor het doctoraal examen werden de volgende onderwerpen bewerkt:

Prof. Dr. D. J. Kuenen: Over polyedrie van de kleermot (Tineola biselliella), bewerkt op de Afdeling Fundamentele Research (Biologie) van het Vezelinstituut T.N.O. te Delft.

Prof. Dr. H. J. Lam: Systematiek van enkele geslachten van de familie der Sapotaceae.

Dr. W. Vervoort: Morphologie en histochemie van het haar bij muizen en cavia's, bewerkt op de Afdeling Fundamentele Research (Biologie) van het Vezelinstituut T.N.O. te Delft.

Dr. H. P. Wolvekamp: Over de zuurstof-dissociatie krommen van runderbloed bij verschillende CO_2 spanningen.

In 1949/'50 was ik assistente b.b. bij het Rijksherbarium, van 1950 tot 1952 werkte ik als assistente b.b. op de Afdeling Experimentele Dierkunde (Afdeling Physiologie) van het Zoölogisch Laboratorium; in beide gevallen was ik belast met de zorg voor practica.

Van 1955 tot 1958 kon ik dank zij een subsidie van de Gezondheidsorganisatie T.N.O. als assistente worden aangesteld bij het Laboratorium voor Tropische Hygiene der Rijksuniversiteit te Leiden, Directeur Prof. Dr. J. E. Dinger. Hier werd onder leiding van Dr. H. L. Wolff een onderzoek aangevangen over de invloed van bepaalde anionen op de reproductie van bofvirus, hetgeen later mede onder leiding van Prof. Dr. H. Veldstra werd uitgebreid tot poly-anionen in meer algemene zin.

STELLINGEN

1. De bij ons onderzoek verkregen resultaten maken aannemelijk, dat Suramine door de cellen van het chorioallantois membraan wordt opgenomen.
   Dit proefschrift, pagina 91.

2. Het gebruik van de term „competition" voor alle schadelijke interacties tussen organismen, welke de populatie dichtheid daarvan beinvloeden, draagt niet bij tot verheldering van het inzicht in deze relaties.
   Andrewartha, H. G. & Birch, L. C. (1954);
   The distribution and abundance of animals, Chicago, University of Chicago Press, pagina 20.

3. Epstein en Hagen zijn bevooroordeeld in de verklaring van de door hen waargenomen interacties bij de opname van alkalikationen door gerst wortels.
   Epstein, E. & Hagen, C. E. (1952)
   Plant Physiol., 27, 457.

4. Voor een logische begripsvorming is het aan te bevelen, het levensvormen-systeem van Raunkiaer te bevrijden van mesologische, taxonomische en groeivorm elementen.
   vgl. Braun-Blanquet, J. (1951)
   Pflanzensoziologie, Wien, Springer Verlag, pagina 29.

5. Voor een beter begrip van het mechanisme van de oversprong zijn quantitatieve metingen noodzakelijk.

6. De veronderstelling van Klenk en Lempfrid, dat de bij de inwerking van „receptor destroying enzyme" op erythrocyten stroma tevens vrijgekomen aminozuren en laag moleculaire peptiden uitsluitend ontstaan zouden zijn door inwerking van de in het stroma aanwezige proteolytische fermenten, is onjuist.
   Klenk, E. & Lempfrid, H. (1957)
   Z. Physiol. Chemie, 307, 278.

7. Men kan met Phillips en medewerkers aannemen, dat bij het door deze onderzoekers gebruikte antigeen, geisoleerd uit Brucella abortus cellen, het desoxyribonucleinezuur bijdraagt tot de specificiteit.
   Phillips, J. H., Braun, W., Plescia, O. J. (1958)
   Nature, 181, 573.

8. Bij het onderzoek over de physiologische werking van kinetine (6-furfurylaminopurine) dient men er op bedacht te zijn, dat het in wezen om adenine effecten kan gaan.
vgl. Strong, F. M. (1958)
Topics in Microbial Chemistry, New York, Wiley.

9. „Multiplicity reactivation" bij influenzavirus wordt door de proeven van Henle en Liu niet overtuigend bewezen.
Henle, W. & Liu, O. C. (1951)
J. Exp. Med., 94, 305.

10. De uitvinding van de langspeelplaat leidt ontegenzeggelijk tot vervlakking van het werkelijke muzikale beleven.